



**Impact du dioxyde de carbone sur la levure
Saccharomyces cerevisiae : caractérisation du transfert
liquide/gaz et implications sur les métabolismes
énergétiques**

Lannig Richard

► **To cite this version:**

Lannig Richard. Impact du dioxyde de carbone sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* : caractérisation du transfert liquide/gaz et implications sur les métabolismes énergétiques. Mycologie. INSA de Toulouse, 2014. Français. NNT : 2014ISAT0041 . tel-01242820

HAL Id: tel-01242820

<https://theses.hal.science/tel-01242820>

Submitted on 14 Dec 2015

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



THÈSE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par : Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse

Discipline ou spécialité : Ingénieries Microbienne et Enzymatique

Présentée et soutenue par : Lannig Richard

Le : 12 décembre 2014

Titre :

Impact du dioxyde de carbone sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* : caractérisation du transfert liquide / gaz et implications sur les métabolismes énergétiques.

Ecole doctorale :

Ecole doctorale SEVAB : Ingénieries microbienne et enzymatique

Unité de recherche

Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés

CNRS UMR 5504, INRA UMR 792, INSA 135 Avenue de Rangueil-31077 Toulouse, France

Directeur de thèse

Pr. Jean-Louis Uribelarrea

Membres du jury

M. Dussap Claude-Gilles	Professeur Université de Clermont-Ferrand	Rapporteur
Mme Devin Anne	Directrice de recherches CNRS	Rapporteur
Mme Gentric Caroline	Professeur Université de Nantes	Examineur
M. Guillouet Stéphane	Professeur INSA Toulouse	Président du Jury
M. Jean-Louis Uribelarrea	Professeur INSA Toulouse	Directeur de thèse

Nom : Richard

Prénom : Lannig

Titre

Impact du dioxyde de carbone sur la levure *Saccharomyces cerevisiae* : caractérisation du transfert liquide / gaz et implications sur les métabolismes énergétiques.

Année : 2014

Lieu : INSA Toulouse

Résumé

L'objectif de ce travail est l'étude de l'impact du dioxyde de carbone (CO_2) sur la physiologie et le métabolisme de la levure *Saccharomyces cerevisiae*, en particulier son impact sur le catabolisme oxydatif du glucose et son rôle dans le déclenchement de la transition respiro-fermentaire. Le CO_2 est au cœur des interactions entre phénomènes biologiques et phénomènes physiques de transfert existant au sein d'un réacteur biologique. La compréhension de son impact sur la physiologie de la levure nécessite la connaissance de sa concentration en phase liquide et donc la maîtrise des phénomènes de transfert interphasiques.

Le transfert liquide / gaz du CO_2 en fermenteur a été étudié par une approche couplant modélisation et expérimentation avec un effort particulier sur l'analyse intégrée des phénomènes biologiques et de transfert. En comparaison avec les hypothèses de transfert généralement admises une sursaturation du moût en CO_2 dissous dans le moût a été observée lors de cultures de *S.cerevisiae* et attribuée à l'existence d'une distribution asymétrique de tailles de bulles de la phase dispersée. Il a été démontré que le transfert liquide / gaz du CO_2 lors d'une culture microbienne intensive ne peut être décrit par analogie avec le transfert gaz / liquide de l'oxygène et que la connaissance de la concentration en CO_2 dissous ne peut être réalisée que par sa mesure directe.

L'impact du CO_2 sur le métabolisme oxydatif de la levure a été investigué par le suivi de la réponse dynamique de la réponse à différents incréments mesurés de la concentration en CO_2 dissous en culture continue. Cette réponse est constituée d'une réponse transitoire et intense et d'une réponse à long-terme plus modérée. Elle se caractérise par l'impact du CO_2 sur l'énergétique cellulaire en augmentant la génération et la dissipation d'énergie ce qui est traduit à court-terme par une augmentation transitoire de +24 à +37 % des vitesses spécifiques de respiration lors d'échelons de la concentration en CO_2 dissous de +2.96 et +5.29 mM et à long-terme par une diminution de 18% Y_{ATP} de % lorsque la concentration en CO_2 dissous augmente de 1.6 mM à 17 mM.

L'effet du CO_2 sur la transition respiro-fermentaire a été étudié en culture de type accélérostat en présence d'une concentration élevée en CO_2 dissous. Dans ces conditions, la bascule vers le métabolisme réductif est obtenue pour un taux de croissance (0.122 h^{-1}) et des vitesses spécifiques de respiration ($5.2 \text{ mmole}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) inférieurs aux valeurs obtenues avec un accélérostat sans apport exogène de CO_2 (0.256 h^{-1} et $8.65 \text{ mmole}_{\text{O}_2} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) respectivement. Cette modification du métabolisme n'a pu être corrélée directement à un déficit de potentiel énergétique oxydatif et semble probablement liée à une perte de flexibilité d'adaptation à la dynamique de variation de l'environnement.

Mots-clés : Dioxyde de carbone, levure, transfert, Effet Crabtree, stress.

Last-Name: Richard

First-name: Lannig

Title

Carbon dioxide impact on *Saccharomyces cerevisiae*: study of the liquid/ gas mass transfer and consequences on the energetics.

Year: 2014

Institution: INSA Toulouse

Abstract

The aim of this work was to evaluate the impact of carbon dioxide (CO₂) on the physiology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, more precisely on the oxidative metabolism and on the onset of alcoholic fermentation. CO₂ is involved in the interactions between transfer phenomena and biological phenomena in fermenters. The knowledge of the dissolved CO₂ concentration and then of the CO₂ liquid / gas mass transfer phenomena is required to assess the impact of this compound on the yeast physiology.

Investigation of CO₂ liquid / gas in biological reactors has been carried out using simulations and experiments taking into consideration both biological and transfer phenomena. CO₂ supersaturation was observed in an intensive fed-batch culture of *S.cerevisiae* and may be caused by an asymmetric bubble size distribution of the gas phase. We demonstrated that CO₂ liquid / gas transfer cannot be described based on O₂ gas / liquid transfer and that CO₂ concentration must be estimated through direct measurement.

The impact of CO₂ on the oxidative metabolism of *S.cerevisiae* was investigated using chemostat cultures submitted to different step-increases of the dissolved CO₂ concentrations with direct measurement of the dissolved CO₂ concentration. The yeast culture showed a transient response with an increase of the specific respiration rates ranging from with a +24 to +37 % during + 2.96 mM and +5.29 mM dissolved CO₂ step-increases. This transient response was followed by a long-term response characterized by a decrease of the Y_{ATP} value with increasing dissolved CO₂ concentrations (down to -18% when the CO₂ concentration increased from 1.6 mM to 17 mM).

The impact of CO₂ on the onset of the Crabtree effect in *S.cerevisiae* was investigated using the accelerostat technique with and without CO₂ enrichment. The onset of alcoholic fermentation occurred at a much lower specific growth rate (0.122 h⁻¹) and specific oxygen consumption rate (5.2 mmole_{O₂}·g_X⁻¹·h⁻¹) in CO₂ enriched conditions than without CO₂ enrichment (0.256h⁻¹ and 8.65 mmole_{O₂}·g_X⁻¹·h⁻¹ respectively). These modifications may be linked with a decreased cellular adaptability to changing environment.

Keywords : Carbon dioxide, yeast, transfer, Crabtree effect, stress.

Remerciements

Ces travaux de thèse ont été réalisés au Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés à l'Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse entre octobre 2010 et octobre 2013, au sein de l'équipe Fermentation Advanced and Microbial Engineering, dans le cadre d'une bourse du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche.

Je remercie Mme Anne Devin et M. Claude-Gilles Dusapp d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse ainsi que Mme Caroline Gentric pour avoir accepté d'examiner mon travail. Je remercie également M. Stéphane Guillouet d'avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie enfin l'ensemble des membres du jury pour leur participation à mon jury de thèse ainsi que pour la discussion intéressante que nous avons eu à cette occasion.

Je remercie chaleureusement mon directeur de thèse Jean-Louis Uribelarrea ainsi que mon co-directeur (officieux) de thèse Stéphane Guillouet pour avoir co-encadré ces travaux de thèse. Je leur suis reconnaissant pour tout ce qu'ils m'ont appris au cours des quelques années passées au laboratoire et surtout pour m'avoir transmis leur passion du process.

Je remercie également Mme Carole Jouve, directrice de l'équipe Fermentation Advanced and Microbial Engineering, et M. Claude Maranges, directeur de l'école doctorale SEVAB, pour leur soutien.

Je remercie tous les membres du LISBP en général et de l'équipe Fermentation Advanced and Microbial Engineering en particulier que j'ai cotoyé au cours de ma thèse. Merci pour ce contexte scientifique stimulant et ces conditions de travail idéales.

Les remerciements de cette Nam-Nam thèse ne seraient pas complets sans parler de la Nam-Nam Team. Merci donc à Jillian, Julie et Laurie pour leur soutien et leur amitié durant ces années de galère. Que de bons moments partagés au labo et en dehors !

Merci à mes collègues Julien, Cyril et les deux Adeline pour leurs encouragements lors de la rédaction.

Merci aux copains du bagad pour les festoù-noz, répés et autres sorties défouloir !

Merci à mes amis INSAiens Marie, Elsa, Pauline, Marie-France, Guilhem, Seydou, Vincent, Camille, David et Célia qui m'ont soutenu tout au long de cette thèse. Bravo et merci à eux d'avoir réussi à me supporter !

Merci aux copains de toujours Cédric et Eric.

Merci à mes parents et à mes sœurs Gwenn, Maëlle, Hélène et Laurence de m'avoir encouragé et soutenu tout au long de mes études.

Enfin merci à Maëla pour sa patience lors des longues semaines de manip et pour m'avoir supporté lors de la période de rédaction.

Table des matières

Introduction et contexte de l'étude	21
Contexte	22
Objectifs et stratégie	23
Présentation du manuscrit	25
1. Etat de l'art	27
1.1 Métabolisme de la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
1.1.1 Métabolisme oxydatif	30
1.1.2 Métabolisme fermentaire	30
1.1.3 Métabolisme oxydo-réductif	31
1.2 Effet Crabtree	31
1.2.1 Répression catabolique	31
1.2.2 Notion de capacité respiratoire limite	34
1.2.3 Essais d'identification d'une étape limitant la capacité oxydative	37
1.2.3.1 Chaîne respiratoire	37
1.2.3.2 Nœud du pyruvate et by-pass de la Pyruvate Déshydrogénase	38
1.2.4 Modulateurs globaux	42
1.2.4.1 Mig1 / Mig2	42
1.2.4.2 Hap4p	43
1.2.4.3 Modification de la balance redox cytosolique	44
1.2.4.4 Autres effecteurs de la transition respiro-fermentaire	47
1.2.5 Identification des paramètres caractéristiques du shift oxydo-fermentaire	47
1.3 Impact du dioxyde de carbone sur la physiologie de <i>S. cerevisiae</i>	53
1.3.1 Implication du dioxyde de carbone dans le métabolisme de <i>S. cerevisiae</i>	53
1.3.1.1 Anabolisme et catabolisme	53
1.3.1.2 Cas de l'enzyme Anhydrase carbonique	54
1.3.2 Effet inhibiteur du dioxyde de carbone	55
1.3.2.1 Métabolisme fermentaire	56
1.3.2.2 Métabolisme oxydo-fermentaire	59
1.3.2.3 Métabolisme oxydatif	61
1.3.2.4 Analyse transcriptomique de l'effet inhibiteur du dioxyde de carbone	63
1.3.3 Mécanismes d'action du dioxyde de carbone	66
1.3.3.1 Action sur le pH intracellulaire	66
1.3.3.2 Action sur la membrane plasmique	68
1.3.3.3 Action sur la synthèse ou l'activité d'enzymes	69
1.3.3.4 Effet d'action de masse	70
1.3 Transfert interphasiques du dioxyde de carbone en bioréacteur	70
	5

1.3.2	Solubilité du dioxyde de carbone et de l'oxygène	70
1.3.3	Equilibres dynamiques du CO ₂ en phase liquide	71
1.3.4	Transfert biomasse / liquide	74
1.3.5	Nucléation	76
1.3.6	Transfert liquide / gaz	76
1.3.6.1	Cas général	76
1.3.6.2	Facteurs influençant le K _L a	79
1.3.6.3	Analyse de l'impact de la puissance dissipée	81
1.3.6.3.1	Sur le coefficient de transfert dans le film liquide kl	81
1.3.6.3.2	Sur l'aire interfaciale / sur la dispersion gaz liquide	82
1.3.6.4	Influence de l'accélération : chimique ou biologique	89
1.3.7	Transfert liquide / gaz du CO ₂	89
1.3.7.1	Analogie avec le transfert gaz / liquide de l'oxygène	89
1.3.7.2	Etude du transfert interphasique du CO ₂ en l'absence de réaction biologique	91
1.3.7.3	Etude du transfert interphasique du CO ₂ lors de cultures microbiennes	94
1.3.7.4	Accélération du transfert interphasique du dioxyde de carbone	97
1.3.7.4.1	Accélération chimique	97
1.3.7.4.2	Accélération biologique	97
1.4	Détermination du cadre de l'étude et de la problématique scientifique	100
2.	Matériel et méthodes	104
2.1	Souche et milieux de culture	105
2.1.1	Souche utilisée	105
2.1.2	Milieux de culture	105
2.1.2.1	Milieux riches	105
2.1.2.2	Milieux synthétiques	105
2.1.2.2.1	Culture discontinue alimentée	105
2.1.2.2.1.1	Milieu salin initial	105
2.1.2.2.1.2	Milieu salin d'alimentation	106
2.1.2.2.1.3	Solution de vitamines	106
2.1.2.2.2	Culture continue	107
2.1.2.2.2.1	Définition du milieu de culture	107
2.1.2.2.2.2	Assemblage des milieux	108
2.2	Mise en œuvre des cultures	111
2.2.1	Conservation des souches	111
2.2.2	Chaîne de propagation	111
2.2.2.1	Culture discontinue alimentée	111
2.2.2.2	Culture continue	112
2.2.3	Cultures en fermenteurs	112

2.2.3.1	Culture discontinue alimentée	112
2.2.3.1.1	Description du dispositif expérimental	112
2.2.3.1.2	Conduite de culture	114
2.2.3.1.3	Description du dispositif expérimental	116
2.2.3.1.4	Conduite de culture	118
2.3	Techniques analytiques	118
2.3.1	Stratégie d'échantillonnage	118
2.3.2	Analyse de la phase biomasse	119
2.3.2.1	Détermination de la concentration en biomasse	119
2.3.2.1.1	Méthode turbidimétrique	119
2.3.2.1.2	Méthode gravimétrique	119
2.3.2.2	Détermination de la composition élémentaire en biomasse	120
2.3.2.3	Détermination de la teneur intracellulaire en sucres de réserve	120
2.3.2.4	Thermogravimétrie	121
2.3.3	Analyse de la phase liquide	121
2.3.3.1	H.P.L.C	121
2.3.3.2	G.C	122
2.3.3.3	Y.S.I	122
2.3.3.4	Kits enzymatiques	122
2.3.3.4.1	Glucose	122
2.3.3.4.2	Acétate	123
2.3.3.4.3	Ethanol	124
2.3.3.5	ICP-MS	125
2.3.4	Paramètres physico-chimiques et rhéologiques	127
2.3.4.1	Viscosité dynamique	127
2.3.4.2	Tension de surface	128
2.3.4.3	Masse volumique	129
2.3.5	Mesure de la puissance dissipée	129
2.3.6	Capteurs à CO ₂ dissous	136
2.3.7	Analyse des gaz	138
2.4	Traitement des résultats	139
2.4.1	Traitement des gaz	139
2.4.1.1	Définition du système considéré	139
2.4.1.2	Calcul du débit gazeux de sortie	141
2.4.1.3	Calcul de la vitesse de consommation d'oxygène	141
2.4.1.4	Calcul de la vitesse de production de dioxyde de carbone	143
2.4.1.5	Calcul du coefficient respiratoire	144
2.4.2	Calcul des vitesses pour les composés en solution	145
2.4.3	Lissage et réconciliation des données	145
2.4.4	Bilans molaires et élémentaires	146
2.4.4.1	Généralités	146
2.4.4.2	Bilan carbone	148
2.4.4.3	Bilan redox	148

2.4.5	Modélisation métabolique	149
3.	Etude du transfert croisé O ₂ / CO ₂ en conditions de culture microbienne intensive	151
3.1	Introduction	152
3.2	Développement des modèles	152
3.2.1	O ₂ and CO ₂ mass transfer model	153
3.2.2	Bubble Size Distribution (BSD) model	156
3.3	Publication	162
3.3.1	Abstract	163
3.3.2	Introduction	163
3.3.3	Material and methods	166
3.3.3.1	Reactor setup	166
3.3.3.2	On-line measurements	167
3.3.3.3	Analytical methods	168
3.3.3.4	Micro-organism and media	168
3.3.3.5	Culture strategy	169
3.3.3.6	Calculation of O ₂ gas / liquide volumetric transfer coefficient	169
3.3.4	Results	171
3.3.4.1	Mass transfer model	171
3.3.4.2	<i>S. cerevisiae</i> fed-batch culture	173
3.3.4.3	O ₂ gas / liquid and CO ₂ liquid / gas transfer	175
3.3.5	Discussion	177
3.3.5.1	Bubble size distribution	178
3.3.5.2	Bubble Size Distribution parameter estimation during the culture	180
3.3.6	Conclusion	182
3.4	Récapitulatif des résultats	183
4.	Etude de la réponse à court-terme et à long-terme de <i>S. cerevisiae</i> à des incréments de la concentration en dioxyde de carbone dissous	185
4.1	Introduction	186
4.2	Publication	187
4.2.1	Abstract	188
4.2.2	Introduction	188
4.2.3	Material and methods	190
4.2.3.1	Reactor setup	190
4.2.3.2	On-line measurements	191
4.2.3.3	Analytical procedures	191
4.2.3.4	Microorganism and media	193
4.2.3.5	Rate calculation, mass balances and metabolic model.	193
4.2.3.6	Chemostat and CO ₂ step-increases experiments	194

4.2.4	Results	195
4.2.4.1	Steady-state characteristics	195
4.2.4.2	Short-term response to a single step-increase of the CO _{2,1} concentration	196
4.2.4.3	Short-term responses to repeated step-increases of CO _{2,1} concentration	202
4.2.5	Discussion	205
4.2.5.1	Long-term response to a CO ₂ shift-up	205
4.2.5.2	Short-term responses to step-increases of CO _{2,1} concentration	208
4.2.5.3	Acquisition of resistance to high CO ₂ concentration	210
4.2.6	Conclusion	212
4.3	Impact of CO ₂ on the intracellular pH	213
4.4	Oscillatory behavior of the yeast transient response to CO ₂	214
4.6	Récapitulatif des résultats	217
5.	Etude de l'impact du dioxyde de carbone sur la transition respiro-fermentaire chez <i>S. cerevisiae</i>	219
5.1	Introduction	220
5.2	Publication	221
5.2.1	Abstract	222
5.2.2	Introduction	222
5.2.3	Material and methods	225
5.2.3.1	Reactor setup	225
5.2.3.2	On-line measurements	225
5.2.3.3	Analytical procedures	225
5.2.3.4	Micro-organism and media	226
5.2.3.5	Rate calculation, mass balances and metabolic model	226
5.2.3.6	Chemostat and accelerostat	227
5.2.4	Results	228
5.2.4.1	Steady-states	228
5.2.4.2	Accelerostat without CO ₂ enrichment	229
5.2.4.3	Accelerostat with CO ₂ enrichment	230
5.2.5	Discussion	234
5.2.5.1	High dissolved CO ₂ concentration impacted the cellular adaptability	234
5.2.5.2	CO ₂ impacted the yeast energetics	235
5.2.5.3	CO ₂ created an osmotic stress	237
5.2.5.4	CO ₂ impacted the critical dilution rate	239
5.2.6	Conclusion	240
5.3	Récapitulatif des résultats	242
6.	Discussion générale et perspectives	243
	Références bibliographiques	253

Annexes	277
1. Influence de la température et de la composition du milieu sur les coefficients de Henry	278
2. Influence de la composition du milieu sur les constantes d'équilibre	282
3. Nucléation	283
4. Accélération du transfert gaz / liquide de l'O ₂	286
5. Réactions prises en compte dans le modèle métabolique	287

Liste des figures

Figure 1. Identification des questions scientifiques. Les flèches pleines identifient des phénomènes de transfert, les flèches en pointillé illustrent des relations de causalité.	24
Figure 2. Voies métaboliques impliquées dans le catabolisme chez la levure <i>S. cerevisiae</i> . Les précurseurs métaboliques utilisés dans l'anabolisme sont indiqués en bleu, le nom des enzymes impliquées dans les voies métaboliques du nœud du pyruvate en vert (PC : Pyruvate Carboxylase, PDH : Pyruvate Déshydrogénase, PDC : Pyruvate Décarboxylase, ALD : Acétaldéhyde Déshydrogénase, ADH : Alcool déshydrogénase, ACS : Acétyl-CoA Synthétase).	29
Figure 3. Effet de répression catabolique par le glucose chez <i>S. cerevisiae</i> d'après (Gancedo, 1998). RD : Regulatory domain, KD : catalytic domain, Snf : protéine kinase. Les flèches en trait plein illustrent des interactions, la flèche en trait pointillé indique un changement de localisation : Mig1 est nucléaire alors que Mig1p est cytosolique.	33
Figure 4. Existence d'une capacité respiratoire limite pour une croissance sur glucose chez <i>S. cerevisiae</i> d'après (Sonnleitner and Käppeli, 1986). Les flèches bleues représentent un flux de glucose, les flèches rouges un flux d'éthanol. A : cas du substrat glucose. 1 : le flux de glucose est sub-critique. 2 : le flux de glucose est critique. 3 : le flux de glucose est supra-critique et une partie du flux de glucose est donc métabolisé par la voie réductive ce qui donne lieu à la synthèse d'éthanol. B : cas d'un double substrat glucose et éthanol. 4 : les flux de glucose et d'éthanol sont sub-critiques. 5 : le flux de glucose est sub-critique et est métabolisé entièrement par la voie oxydative, une partie du flux d'éthanol ne peut être consommé par la voie oxydative et l'éthanol substrat s'accumule. 6 : le flux de glucose est critique, le flux d'éthanol ne peut plus être consommé par la voie oxydative et l'éthanol substrat s'accumule. 7 : le flux de glucose est supra-critique et une partie du flux de glucose est donc métabolisé par la voie réductive ce qui donne lieu à la synthèse d'éthanol, le flux d'éthanol substrat ne peut être consommé par la voie oxydative et l'éthanol substrat s'accumule.	35
Figure 5. A : Impact du dioxyde de carbone sur le rendement en biomasse (symboles pleins) et le taux de croissance (symboles vides) de <i>S. cerevisiae</i> en anaérobiose. Renger, 1991 : culture discontinue. Aguilera, 2004 : Culture continue. Karl, 1997 : culture discontinue alimentée. B : Impact du dioxyde de carbone sur la production d'éthanol (symboles pleins) et de glycérol (symboles vides) par <i>S. cerevisiae</i> en anaérobiose. Renger, 1991 : culture discontinue, rendements en éthanol et glycérol. Aguilera, 2004 : culture continue, vitesse spécifique de production d'éthanol et glycérol. Knatchbull, 1987 : culture discontinue, anaérobiose, concentration maximale en éthanol. Karl, 1997 : culture discontinue alimentée, rendements en éthanol et glycérol.	57
Figure 6. A : Impact du dioxyde de carbone sur le rendement en biomasse (symboles pleins) ou le taux de croissance (symboles vides) de <i>S. cerevisiae</i> en métabolisme oxydo-fermentaire. Kuriyama, 1993 : culture continue limitée en glucose (C) ou par l'apport d'oxygène (O, micro-aérobie), rendement en biomasse. Belo, 2003 : culture discontinue alimentée, concentration maximale en biomasse. Nagahisa, 2005 : culture discontinue, taux de croissance. Campelo, 2004 : fed-batch, taux de croissance. Aguilera, 2004 : culture continue limitée en N, rendement en biomasse. B : Impact du dioxyde de carbone sur la production d'éthanol (symboles pleins) ou de glycérol (symboles vides) de <i>S. cerevisiae</i> en métabolisme oxydo-fermentaire. Kuriyama, 1993 :	

culture continue limitée en glucose (C, aérobie) ou par l'apport d'oxygène (O, micro-aérobie), rendement en éthanol et en glycérol. Belo, 2003 : culture discontinue alimentée, concentration maximale en éthanol.	61
Figure 7. Impact du dioxyde de carbone sur le rendement en biomasse de <i>S. cerevisiae</i> en métabolisme oxydatif. Chen et Gutmanis, 1976 : culture discontinue alimentée. Aguilera, 2004: culture continue limitée en carbone.....	63
Figure 8. Réaction d'hydratation du dioxyde de carbone. Extrait de (Schulz et al., 2006).....	71
Figure 9. Prédominance des espèces du système dioxyde de carbone en fonction du pH dans l'eau et dans un milieu salin (S = 20 PSU, salinité comparable à un moût de fermentation).....	74
Figure 10. Interface gaz / liquide selon le modèle du double film.	77
Figure 11. Evolution de la concentration en dioxyde de carbone dissous dans la couche limite liquide dans le cas d'une désorption avec production simultanée de CO ₂ dans la couche limite. L'épaisseur de la couche limite a été fixée à 20µm, la température à 30°C, la concentration dans la phase liquide est de 13.5 mM et la concentration dans la phase gaz est de 0.135 mM.....	99
Figure 12. Détail permettant de mettre en évidence l'influence de la vitesse de production de CO ₂ sur le profil de concentration dans la couche limite.....	99
Figure 13. Evolution du facteur d'accélération E et du nombre de Hatta correspondant en fonction de la vitesse de production de CO ₂ dans la couche limite liquide. L'épaisseur de la couche limite a été fixée à 20µm, la température à 30°C, la concentration dans la phase liquide est de 13.5 mM et la concentration dans la phase gaz est de 0.135 mM.....	100
Figure 14. Photographie du dispositif expérimental pour la culture discontinue alimentée.....	113
Figure 15. Photographie du dispositif expérimental pour les cultures continues et continues accélérées.	118
Figure 16. Schéma du dispositif de prélèvement des échantillons de surnageant.	119
Figure 17. Principe de la quantification de la concentration en acétate par méthode colorimétrique.....	124
Figure 18. Principe de la quantification de la concentration en éthanol par méthode colorimétrique.....	125
Figure 19. Dispositif d'enrichissement en CO ₂ du mélange gazeux d'entrée.....	139
Figure 20. Schéma du système considéré pour le traitement des gaz.	140
Figure 21. Schéma du système considéré pour le traitement des gaz.....	145
Figure 22. Influence of the BSD skewness on the flow rate probability density function and the partial pressures ratio between the gas and the liquid phase (a: skewness = 2.26 and mean bubble diameter = 400 µm; b : skewness 1.32 and mean bubble diameter = 400 µm).	160
Figure 23. Démarche adoptée pour la résolution du mécanisme de transfert liquide / gaz du CO ₂	161
Figure 24. a Simulation of the evolution of the O ₂ and CO ₂ partial pressures in a 200 µm diameter bubble (residence time 50 s) ascending the reactor (pCO _{2,g} = 0 at t = 0s) b Detail of the pCO _{2,g} overshoot for a 200 µm diameter bubble c Simulation of the evolution of the O ₂ and CO ₂ partial pressures in a 1000 µm diameter bubble (residence time 2 s) ascending the reactor (pCO _{2,g} = 0 at t = 0s) d Details on the pCO _{2,g} evolution (no overshoot). The K _T (O ₂) was considered to be 0.5 s ⁻¹ , the dissolved O ₂ and CO ₂ concentration 9.5 x 10 ⁻² and 3.70 mole.m ⁻³ respectively.....	172

Figure 25. a Growth curves: biomass dry weight, CO ₂ production rate and respiratory quotient b Culture operation: power uptake, superficial velocity, liquid phase volume c O ₂ gas / liquid gradient: dissolved O ₂ partial pressure normalized to the atmospheric pressure, molar fraction of O ₂ in the exit gas d CO ₂ liquid / gas gradient: dissolved CO ₂ partial pressure normalized to the atmospheric pressure, CO ₂ partial pressure in the exit gas.	174
Figure 26. Evolution of the broth physico-chemical properties a surface tension b specific density c hold-up (Hold-up correlation for coalescing and non-coalescing media were established by (Fyferling et al., 2008) in similar conditions) d dynamic viscosity	175
Figure 27. Evolution of the overall volumetric transfer coefficient for O ₂ during the culture...	176
Figure 28. a Evolution of the power uptake and gas superficial velocity during the culture b Evolution of the observed and the theoretical CO ₂ excess factor, hold-up, bubbles mean residence time, power uptake and gas superficial velocity during the culture.....	177
Figure 29. Evolution of the ratio between the partial pressure in the exhaust gas phase and the partial pressure in the liquid phase for a BSD with 200 µm mean diameter bubble and 4.75 skewness.	179
Figure 30. Comparison of a normal and an asymmetric bubble size distribution a Evolution of the probability density function (PDF) and the cumulative distributive function (CDF) of the exhaust BSD flow rate and dispersed BSD flow rate in case of an asymmetric BSD (mean bubble diameter: 200 µm, skewness value: 4.74, excess factor 1.10) b Evolution of the probability density function (PDF) and the cumulative distributive function (CDF) of the exhaust BSD flow rate and dispersed BSD flow rate in case of a symmetric BSD (mean bubble diameter: 200 µm, skewness value: 0.61, excess factor 1.00).	180
Figure 31. Details of the evolution of the estimated skewness (a) and bubble mean diameter (b) of the fitted bubble size distribution throughout the fed-batch culture.	181
Figure 32. Overview of the steady-state chemostat cultures A, B and C carried out in the present work. The arrows represent the step-increases in the dissolved CO ₂ concentration.....	195
Figure 33. Overview of the yeast transient response to the 5.29 mM CO ₂ shift-up. The shift-up was performed at t = 0h.....	200
Figure 34. Overview of the yeast transient response to the 2.96 mM CO ₂ shift-up. The shift-ups was performed at t = 0h.....	201
Figure 35. Overview of the yeast transient response to the 5.34 and 5.27 mM successive CO ₂ shift-up. The shift-ups were performed at t = 0h and t = 1.28h respectively.....	204
Figure 36. Calculated values of Y _{ATP} against the corresponding dissolved CO ₂ concentrations. Y _{ATP} values were calculated using the metabolic model with reconciled values obtained in this work and from (Aguilera et al., 2005b). The error bar represents the standard deviation of the Y _{ATP} values obtained for the three steady-states that were not enriched with CO ₂ (A-SS1, B-SS2 and B-SS1).	206
Figure 37. Succinic acid specific production rate against the corresponding dissolved CO ₂ concentrations. The error bar represents the standard deviation of the q _{succinate} values obtained for the the different steady-states. The values were obtained from this work and from (Aguilera et al., 2005b).	207
Figure 38. Overview of the accelerostat carried out without CO ₂ enrichment.....	232
Figure 39. Overview of the accelerostat carried out with CO ₂ enrichment.....	233

Figure 40. Overview of the accelerostat carried out with CO ₂ enrichment (continued).	234
Figure 41. Calculated ATP and NADH, H ⁺ production and consumption fluxes in the cytosol and the mitochondria over the accelerations.	237
Figure 42. Éléments de réponse aux questions scientifiques.	250
Figure 43. Evolution des coefficients de Henry dans l'eau pure en fonction de la température pour le dioxyde de carbone et l'oxygène.	279

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste des symboles.....	17
Tableau 2. Liste des lettres grecques utilisées.....	19
Tableau 3. Liste des exposants et des indices.....	20
Tableau 4. Description des enzymes catalysant les voies métaboliques du nœud du pyruvate.	38
Tableau 5. Travaux de génie génétique sur les gènes codant pour les enzymes catalysant les réactions impliquées au niveau du noeud du pyruvate.	41
Tableau 6. Détermination du taux de dilution critique en chemostat, accélérostat ou productostat pour les souches sauvages de <i>S. cerevisiae</i>	49
Tableau 7. Détermination du taux de dilution critique en chemostat, accélérostat ou productostat pour les souches mutées de <i>S. cerevisiae</i>	51
Tableau 8. Corrélations empiriques pour le calcul de $K_L a O_2$ en réacteur agité aéré multi-turbines dans le cas de fluides newtoniens.....	81
Tableau 9. Corrélations pour le calcul du diamètre moyen de bulle en réacteur agité aéré.....	84
Tableau 10. Techniques de mesure de tailles de bulles en réacteur agité aéré.	88
Tableau 11. Comparaison des études rapportant une caractérisation de $K_L a(CO_2)$ en culture microbienne.....	96
Tableau 12. Composition du milieu riche YEPD.....	105
Tableau 13. Composition du milieu salin initial (culture discontinue alimentée).....	105
Tableau 14. Composition de la solution de fer pour le milieu salin initial (culture discontinue alimentée).....	106
Tableau 15. Composition du milieu salin d'alimentation (culture discontinue alimentée).....	106
Tableau 16. Composition de la solution de fer 200X pour le milieu salin d'alimentation (culture discontinue alimentée).	106
Tableau 17. Composition de la solution de calcium 50X pour le milieu salin d'alimentation (culture discontinue alimentée).....	106
Tableau 18. Composition de la solution de vitamines 1000X (culture discontinue alimentée). .	107
Tableau 19. Composition du milieu synthétique utilisé pour les cultures continues.	107
Tableau 20. Composition de la solution saline stock (culture continue).....	109
Tableau 21. Composition de la solution stock d'oligo-éléments 500 X (culture continue).	109
Tableau 22. Composition des solutions stocks individuelles d'oligo-éléments (culture continue).	109
Tableau 23. Composition de la solution stock de vitamines 250 X (culture continue).	110
Tableau 24. Composition de la solution stock d'antibiotique 450 X (culture continue).....	110
Tableau 25. Assemblage du milieu initial pour un volume final de 1.8 L (culture continue).....	110
Tableau 26. Assemblage du milieu d'alimentation pour un volume final de 45.0 L (culture continue).....	111
Tableau 27. Composition élémentaire de la biomasse déterminée en culture continue.	120
Tableau 28. Caractérisation géométrique du réacteur Biostat E.	130
Tableau 29. Rapports de dimensions géométriques.....	131
Tableau 30. Hypothèses générales pour le calcul du N_{p0} dans le cas de mobiles d'agitation à débit radial.	131

Tableau 31. Estimation du nombre de puissance pour un mobile d'agitation de type turbine Rushton utilisé dans une configuration géométrique proche de celle de l'étude (Roustan, 2005).	132
Tableau 32. Comparaison des sondes à CO ₂ dissous utilisées.	137
Tableau 33. Résultats de l'estimation paramétrique réalisée sur la réponse impulsionnelle de la sonde InPro 5000.	138
Tableau 34. Composés considérés dans le calcul des bilans.	148
Tableau 35. CO ₂ liquid / gas transfer in microbial cultures: literature review.	166
Tableau 36. Empirical correlations for the observed volumetric transfer coefficients.	176
Tableau 37. Comparison of steady states with or without carbon dioxide in the inlet gas mix.	196
Tableau 38. Comparison of the steady states with or without CO ₂ enrichment.	229
Tableau 39. Comparaison des algorithmes prédictifs des constantes apparentes d'équilibre du dioxyde de carbone.	283

Nomenclature

Tableau 1. Liste des symboles.

Symbole	Description	Unité
a	Aire interfaciale	m^{-1}
A_{in}	Fraction molaire du composé A dans les gaz d'entrée	-
A_{exit}	Fraction molaire du composé A dans les gaz à la sortie de la phase liquide	-
A_{out}	Fraction molaire du composé A dans les gaz de sortie du réacteur	-
b	Largeur des chicanes	m
b'	Distance entre une chicane et la paroi	m
C.I.T	Acronyme de Carbone Inorganique Total	-
d	Diamètre externe d'un mobile d'agitation	m
d_B	Diamètre de bulle	m
d_{32}	Diamètre de Sauter	m
d_{10}	Diamètre moyen arithmétique	m
dO_2	Mesure de la pression partielle en oxygène dissous	% de la saturation
dCO_2	Mesure de la pression partielle en dioxyde de carbone dissous	% de la saturation
D_A	Coefficient de diffusion du composé A	$m^2.s^{-1}$
D	Diamètre interne du réacteur	m
d_i	Diamètre interne du mobile d'agitation	m
E	Facteur d'accélération	-
e	Puissance dissipée par unités de volume	$W.m^{-3}$
f	Fraction molaire	-
F	Facteur d'accumulation intracellulaire	-
g	Accélération de la pesanteur	$m.s^{-2}$
G	Concentration en substrat G dans la phase liquide	$g_G.L^{-1}$
$G_{alimentation}$	Concentration en substrat G dans la solution d'alimentation	$g_G.L^{-1}$
H_L	Hauteur du liquide (pour $V = 10L$)	m
h	Hauteur des chicanes	m
H	Constante de Henry	$mole.m^{-3}.Pa^{-1}$
H_T	Hauteur de réacteur	m
Ha	Nombre de Hatta	-
H.P.C.D	Acronyme de High Pressure Carbon Dioxide (traitement stérilisant utilisant le dioxyde de carbone).	-
I	Force ionique	$mole.m^{-3}$
J	Densité de flux de transfert	$mole.m^{-2}.s^{-1}$
K_a	Constante d'équilibre	-
$K_{H_2CO_3}$	Constante d'équilibre	$mole.m^{-3}$
K_1	Constante d'équilibre	$mole.m^{-3}$
K_2	Constante d'équilibre	$mole.m^{-3}$
k_{+1}^*	Constante cinétique	s^{-1}

k_{-1}^*	Constante cinétique	$\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{+2}	Constante cinétique	s^{-1}
k_{-2}	Constante cinétique	s^{-1}
k_{+3}	Constante cinétique	$\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{-3}	Constante cinétique	s^{-1}
k_{+1}	Constante cinétique	s^{-1}
k_{-1}	Constante cinétique	$\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{++1}	Constante cinétique	s^{-1}
k_{-1}	Constante cinétique	$\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_{+5}	Constante cinétique	s^{-1}
k_{-5}	Constante cinétique	$\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$
k_L	Coefficient de transfert dans le film liquide	$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
k_G	Coefficient de transfert dans le film gaz	$\text{m} \cdot \text{s}^{-1}$
$K_L a (\text{CO}_2)$	Coefficient volumique de transfert du CO_2 défini par rapport à la phase liquide	s^{-1}
$K_L a (\text{O}_2)$	Coefficient volumique de transfert de l' O_2 défini par rapport à la phase liquide	s^{-1}
K_T	Coefficient volumique global de transfert d'un composé défini par rapport à la phase liquide en système biologique	s^{-1}
l	Longueur des pales	m
m	Coefficient de maintenance	$\text{g}_G \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
moles	Quantité de matière	mole
N	Vitesse de rotation de l'arbre d'agitation	s^{-1}
n	Fraction molaire	-
n_B	Nombre de bulles	-
nc	Nombre de chicanes	adimensionnel
n_p	Nombre de pales sur un mobile	adimensionnel
N_{p0}	Nombre de puissance caractéristique d'un mobile d'agitation	adimensionnel
P	Pression absolue	Pa
p	Pression partielle	Pa
P_0	Puissance dissipée en l'absence de ventilation	W
P_g	Puissance dissipée en présence de ventilation	W
$P_{\text{octanol / eau}}$	Coefficient de partition octanol / eau	-
P_{ref}	Pression absolue de référence	Pa
Q	Débit de ventilation	$\text{mole} \cdot \text{s}^{-1}$
q_A	Vitesse spécifique relative à un composé A	$\text{mole} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
r	Distance entre le centre géométrique d'une bille sphérique et la paroi de la bulle	m
r_A	Vitesse volumique relative à un composé A	$\text{mole} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$
$R_{G,X}$	Rendement de biomasse X formée par rapport au substrat G consommé	$\text{g}_G \cdot \text{g}_X^{-1}$
r_{CO_2}	Vitesse volumique de production de CO_2	$\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$
r_{O_2}	Vitesse volumique de consommation d' O_2	$\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$
s	Sursturation de la phase liquide	-
S_G	Aire interfaciale spécifique	m^{-1}
STR	Acronyme pour Stirred Tank Reactor	

	(réacteur agité)	
T	Température	K
T _{ref}	Température de reference	K
U _s	Vitesse superficielle	m.s ⁻¹
V	Volume	m ³
U	Gradient de vitesse sur la distance dB	m ² .s ⁻²
V _G	Volume de la phase gaz	m ³
V _L	Volume de la phase liquide	m ³
V _G ^{headspace}	Volume du ciel gazeux	m ³
V _{m, ref}	Volume molaire dans les conditions de pression et de température de référence	L.mole ⁻¹
V _T	Volume total utile du réacteur	m ³
w	hauteur des pales du mobile d'agitation	m
We	Nombre de Weber critique	-
[X]	Concentration en biomasse	g.L ⁻¹
x	Concentration dans la phase liquide	mole.m ⁻³
Y	Distance entre le centre du mobile d'agitation inférieur et le fond du réacteur	m
y	Concentration dans la phase gaz	mole.m ⁻³
Y _{G,X}	Rendement théorique limite en biomasse formée X par rapport au substrat G consommé	g _G .g _X ⁻¹

Tableau 2. Liste des lettres grecques utilisées.

Symbole	Description	Unité
	Facteur d'excès du CO ₂ dans la phase	
ξ	liquide tel que défini par (Royce and Thornhill, 1991)	-
τ	Constante de temps	s
τ _r	Temps de séjour d'une bulle de rayon r	s
ε	Hold-up	-
σ	Tension de surface	N.m ⁻¹
ρ	Masse volumique	kg.m ⁻³
φ	Flux de transfert	mole.m ⁻³ .s ⁻¹
φ	Flux d'échange	mole.m ⁻³ .s ⁻¹
	Ecart-type de la distribution log-normale des rayons des bulles	
σ _b	(Standard deviation of the bubble radius natural logarithm)	m
μ	Taux de croissance	h ⁻¹

μ_{app}	Viscosité dynamique	Pa.s
μ_b	Moyenne arithmétique de la distribution log-normale des rayons des bulles (Mean of the bubble radius natural logarithm)	m

Tableau 3. Liste des exposants et des indices.

Symbole	Description
CO ₂	Réfère au CO ₂
corrigée	Réfère à une concentration corrigée
eq	Décrit l'équilibre entre la phase gaz et la phase liquide
finale	Réfère à la concentration finale obtenue à la fin d'un échelon de concentration
G	Réfère à la phase gazeuse
i	Réfère à l'interface gaz / liquide
in	Flux d'entrée dans le réacteur
initiale	Réfère à la concentration initiale obtenue au début d'un échelon de concentration
L	Réfère au moût
LB	Réfère à la phase liquide (moût moins le volume humide de la biomasse)
mesurée	Réfère à une concentration mesurée
O ₂	Réfère à l'O ₂
obs	Observé
out	Flux de sortie dans le réacteur
r	Réfère à une bulle de rayon r
th	Théorique
total	Réfère à la somme des composés présents dans une phase
X	Biomasse sèche
*	Valeur de saturation définie selon la loi de Henry

Contexte

La levure anaérobie facultative *Saccharomyces cerevisiae* est utilisée de longue date par l'homme pour la production de pain et de boissons fermentées. Des vestiges de fours à pain et de brasseries datant de -3000 ans ont ainsi été découverts en Egypte. Les levures ont été observées au microscope pour la première fois par Antoni Van Leeuwenhoek à Delft aux Pays-Bas en 1680 mais ce n'est qu'en 1857 que Louis Pasteur associe le procédé de fermentation à un phénomène biologique et non à une catalyse purement chimique.

Les levures sont actuellement utilisées à l'échelle industrielle pour la panification, la production de protéines hétérologues, la production de boissons fermentées, de molécules pharmaceutiques ou d'éthanol carburant. Leur utilisation industrielle a démarré aux Pays-Bas en 1780 par la commercialisation sous forme de crème d'un levain spécialisé pour la panification. En France la production industrielle de levure est introduite par Max de Springer en 1872. Le procédé moderne de production de la levure par conduite discontinue alimentée (fed-batch) est inventé en Allemagne en 1915 et marque le point de départ de la microbiologie industrielle moderne (Confederation of European Yeast Producers, 2013). L'espèce *S. cerevisiae* est actuellement reconnue comme G.R.A.S (Generally Regarded As Safe) par la F.D.A (Federal Drug Administration) (Porro and Branduardi, 2009). Le séquençage du génome de la levure en 1996 (Goffeau et al., 1996) et le développement des outils de génie génétique en font également un hôte de choix pour la production de protéines hétérologues pour l'industrie pharmaceutique (Porro et al., 2005).

La levure *S. cerevisiae* peut présenter différents métabolismes en fonction des conditions environnementales. En présence d'oxygène et pour des concentrations limitées en glucose le métabolisme de la levure est de type oxydatif. Il est caractérisé par un rendement en biomasse maximal (de l'ordre de $0.5 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$) et l'absence de formation de co-produits. Si la concentration résiduelle en glucose ou le flux de consommation de glucose augmentent le métabolisme devient oxydo-réductif : le rendement en biomasse diminue et des co-produits de fermentation sont excrétés (éthanol, glycérol, acétate...). La bascule métabolique entre le métabolisme oxydatif et le métabolisme oxydo-fermentaire en présence d'oxygène correspond à l'effet Crabtree. Malgré une littérature abondante les mécanismes à l'origine de cette transition métabolique n'ont pu être identifiés à ce jour et l'hypothèse la plus couramment admise est l'existence d'une capacité respiratoire limite. La mise en œuvre de la levure dépend de la production : la levure de panification et les protéines recombinantes sont produites en métabolisme oxydatif alors que la production d'éthanol carburant est réalisée en métabolisme

oxydo-fermentaire ou fermentaire. La mise en œuvre optimale des levures en métabolisme oxydatif à l'échelle industrielle ne peut donc être obtenue que par la maîtrise de la bascule métabolique. En effet, lors de cultures de type fed-batch de levure en aérobiose, la productivité en biomasse augmente avec le taux de croissance fixé par l'alimentation jusqu'à un seuil correspondant à la bascule métabolique. La maîtrise de la transition respiro-fermentaire impose la prise en compte des interactions entre les phénomènes biologiques et les phénomènes de transfert (matière, chaleur, quantité de mouvement) au sein de l'environnement contrôlé des réacteurs caractérisé par des paramètres physico-chimiques et rhéologiques.

Le dioxyde de carbone (CO_2) est au cœur de ces interactions entre phénomènes biologiques, phénomènes de transfert et phénomènes physico-chimiques dans les réacteurs biologiques. Le CO_2 est impliqué en tant que produit ou substrat dans de nombreuses réactions du métabolisme microbien y compris des réactions liées à la notion de capacité respiratoire. Pour autant des concentrations élevées en CO_2 dissous peuvent être inhibitrices de la croissance des micro-organismes. De plus, le CO_2 participe aux échanges interphasiques (biomasse / liquide et liquide / gaz) au sein des réacteurs et est impliqué dans des équilibres dynamiques avec les espèces du système carbone inorganique total en phase liquide. La concentration en CO_2 dissous dans le moût de fermentation est donc le résultat d'équilibre entre la production nette biologique, les équilibres ioniques et les phénomènes de transfert. La compréhension de l'impact du CO_2 sur la physiologie et le métabolisme de la levure apparaît indispensable à une mise en œuvre industrielle de ce micro-organisme mais ne peut être détachée de l'environnement dans le réacteur.

Objectifs et stratégie

La problématique sous-jacente à ces travaux de doctorat est la compréhension de l'impact du dioxyde de carbone sur la physiologie et le métabolisme de la levure *S. cerevisiae*. Cette problématique impose de considérer les interactions entre les phénomènes biologiques (réponse métabolique au CO_2) et les phénomènes physiques (phénomènes de transfert, équilibres ioniques).

La démarche scientifique adoptée consiste à réaliser en premier lieu une revue des travaux antérieurs sur l'impact du dioxyde de carbone sur la physiologie de la levure *S. cerevisiae*, ainsi que sur les mécanismes de transfert interphasiques de ce composé en fermenteur. Cet état de l'art permet de dégager les questions scientifiques servant de trame à ce travail et de sélectionner des

outils et des méthodologies pertinents pour y apporter des éléments de réponse. La démarche adoptée et les questions scientifiques en suspens sont illustrées sur la Figure 1.

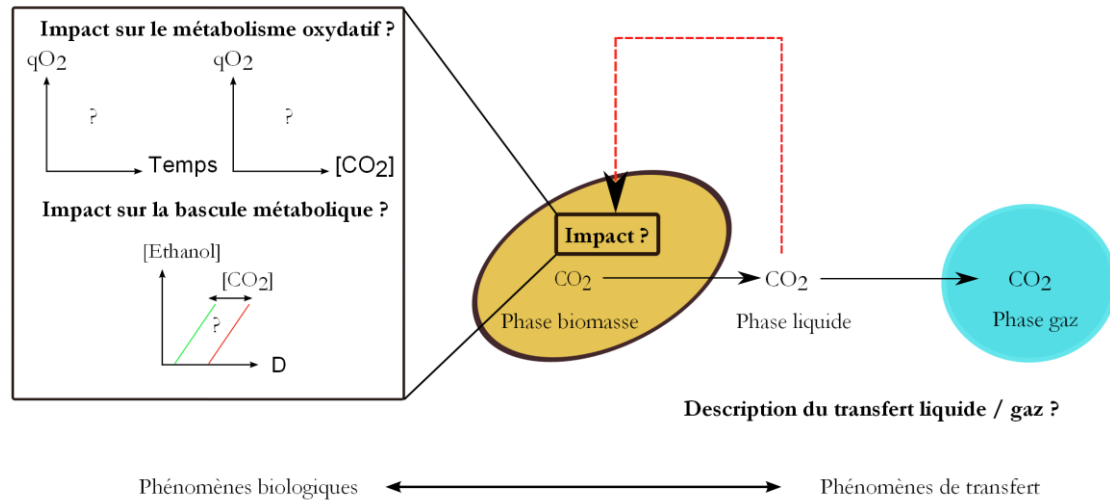


Figure 1. Identification des questions scientifiques. Les flèches pleines identifient des phénomènes de transfert, les flèches en pointillé illustrent des relations de causalité.

La première question scientifique concerne l'étude du transfert liquide / gaz du dioxyde de carbone en réacteur agité aéré. **Comment décrire le transfert liquide / gaz du dioxyde de carbone en conditions de culture microbienne intensive ? En particulier est-il possible d'évaluer la concentration en dioxyde de carbone dissous dans le moût en se basant sur la mesure de la fraction molaire de ce composé dans les gaz de sortie du fermenteur comme décrit dans la littérature ?** L'étude du transfert liquide / gaz du CO₂ a été réalisée en culture discontinue alimentée intensive (fed-batch) afin de reproduire les phénomènes de transfert rencontrés lors de cultures industrielles. De plus, la forte réactivité de ces cultures permet de mieux cerner les interactions entre phénomènes biologiques et phénomènes de transfert.

La seconde question scientifique s'intéresse à l'effet du CO₂ sur la physiologie des micro-organismes en conditions de culture microbienne. **En particulier, quel est l'impact de la concentration en dioxyde de carbone dissous sur le métabolisme oxydatif de la levure *S. cerevisiae* ?** L'étude de cet impact a été réalisée par le suivi de la réponse dynamique de la levure à des incréments de la concentration en CO₂ dissous en culture continue (chemostat). Cette stratégie permet de distinguer la réponse à court-terme et la réponse à long-terme de la levure à

une perturbation de l'homéostasie cellulaire par le CO₂ et donc d'évaluer quantitativement les différents modes d'action possibles de ce composé.

La troisième question scientifique s'intéresse à l'impact du CO₂ sur le déclenchement de la bascule métabolique chez la levure. **Quel est l'impact du dioxyde de carbone sur le déclenchement de la transition respiro-fermentaire chez *S. cerevisiae*?** Cet effet a été étudié en culture continue accélérée (accélérostat) en présence ou en absence d'enrichissement en CO₂. La culture en accélérostat permet en effet d'approximer un état de régime permanent et donc de balayer une large gamme de taux de dilution. La comparaison du métabolisme d'une culture témoin et d'une culture à forte concentration en CO₂ dissous lors de l'accélération permet d'apporter des éléments de réponse sur le rôle du CO₂ dans le déclenchement de l'effet Crabtree.

Présentation du manuscrit

Ces travaux de doctorat ont été réalisés d'octobre 2010 à octobre 2013 dans l'équipe de génie microbiologique FAME (Fermentation Engineering and Microbial Engineering) du Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés (LISBP) de Toulouse et ont été financés par un contrat doctoral du Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche. Ils bénéficient des travaux réalisés auparavant par Mathias Fyferling sur l'étude du transfert d'oxygène en conditions de culture microbienne intensive (Fyferling, 2007) et par Jean-Roch Mouret, David Féria-Gervasio et Jillian Marc sur la transition respiro-fermentaire chez *S. cerevisiae* (Mouret, 2006; Féria-Gervasio, 2008; Marc et al., 2013).

Ce manuscrit de thèse est organisé en 6 chapitres.

Le chapitre 1 consiste en une synthèse des données rapportées dans la littérature sur le transfert liquide / gaz du CO₂ et sur l'impact de la concentration en CO₂ dissous sur la physiologie des micro-organismes, notamment la levure *S. cerevisiae*. Les travaux existant sur la transition respiro-fermentaire (Effet Crabtree) sont également présentés. Les questions scientifiques servant de trame à ce travail de thèse sont dégagées en conclusion de cet état de l'art (chapitre 1.4).

Le chapitre 2 présente les matériels et méthodes utilisés au cours de ce travail expérimental.

Les résultats obtenus et leur discussion sont présentés et discutés dans les chapitres 3, 4 et 5. Le chapitre 3 s'intéresse à la caractérisation du transfert liquide / gaz du CO₂ en réacteur agité aéré en conditions de culture microbienne et à l'identification des mécanismes sous-jacents aux phénomènes observés. Dans le chapitre 4 l'impact du CO₂ dissous sur le métabolisme oxydatif de la levure est étudié en culture continue par la comparaison des réponses à court terme et à long-

terme à différents incréments de la concentration en CO₂ dissous. Dans le chapitre 5 le rôle du dioxyde de carbone dans la transition d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme oxydo-fermentaire a été étudié par la comparaison de cultures de type accélérostat réalisées avec et sans enrichissement en CO₂. Ces 3 chapitres sont rédigés sous forme de publications scientifiques qui ont été soumises dans des journaux scientifiques internationaux à comité de lecture.

Le chapitre 6 présente les conclusions pouvant être dégagées des résultats originaux obtenus dans cette étude et propose des perspectives sur de nouvelles investigations.

1. Etat de l'art

Les levures sont des organismes unicellulaires appartenant au règne Fungi et à la division des Ascomycètes. A ce titre les levures sont donc des organismes eucaryotes, chimio-hétérotrophes et capables de se reproduire de façon asexuée (par bourgeonnement d'une forme haploïde) et sexuée (par conjugaison de deux génomes haploïdes pour former un organisme diploïde). Dans certaines conditions de carence l'organisme diploïde peut former des spores haploïdes susceptibles de germer.

La souche diploïde prototrophe CEN.PK 122 a été sélectionnée comme la souche de référence dans les études de génie génétique, de physiologie et de génie microbiologique lors du programme « Yeast as Cell Factory » (van Dijken et al., 2000). Les performances de cette souche en matière de croissance, d'efficacité de transformation, de capacité de sporulation et de production de protéines hétérologues ont en effet été jugées supérieures à celles des souches CBS8066, BAY.17 et X2180 utilisées auparavant. La souche CEN.PK 113-7D est une souche haploïde dérivée de CEN.PK 122.

1.1 Métabolisme de la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Le comportement de la levure *S. cerevisiae* dépend des voies cataboliques empruntées et il est possible de distinguer trois types de métabolisme en fonction des conditions de mise en œuvre du micro-organisme : oxydatif, fermentaire et oxydo-réductif. Une vue d'ensemble du métabolisme de *S. cerevisiae* est présentée sur la Figure 2.

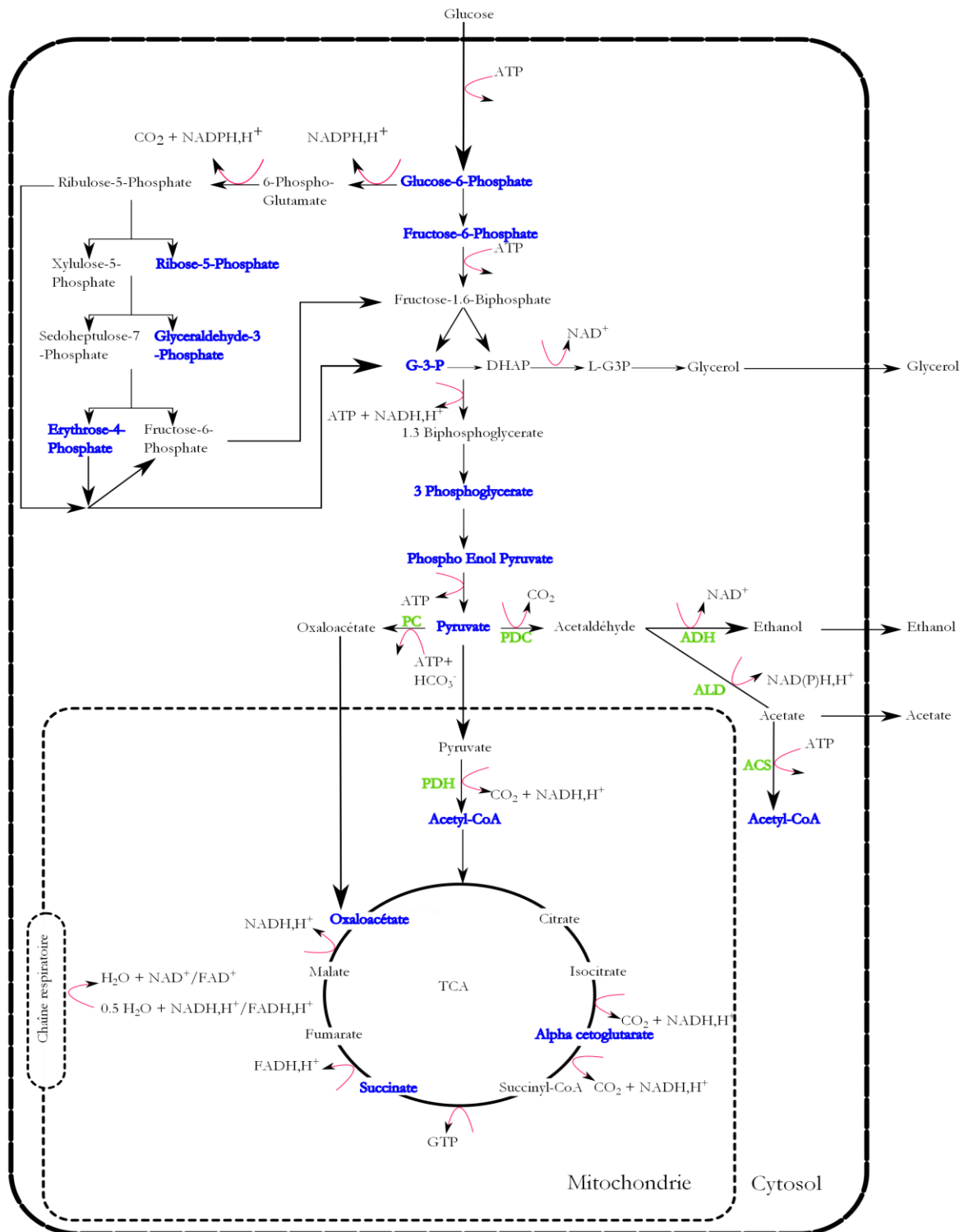
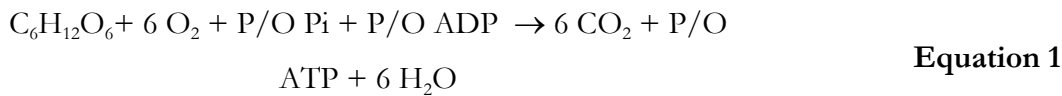


Figure 2. Voies métaboliques impliquées dans le catabolisme chez la levure *S. cerevisiae*. Les précurseurs métaboliques utilisés dans l'anabolisme sont indiqués en bleu, le nom des enzymes impliquées dans les voies métaboliques du nœud du pyruvate en vert (PC : Pyruvate Carboxylase, PDH : Pyruvate Déshydrogénase, PDC : Pyruvate Décarboxylase, ALD : Acétaldéhyde Déshydrogénase, ADH : Alcool déshydrogénase, ACS : Acétyl-CoA Synthétase).

1.1.1 Métabolisme oxydatif

Le métabolisme oxydatif est mis en place en aérobiose et si la valeur du flux glycolytique n'excède pas une valeur seuil (correspondant à une vitesse spécifique de consommation de glucose d'environ $3 \text{ g}_{\text{glucose}} \cdot \text{g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) (Féria-Gervasio, 2008). Un métabolisme oxydatif peut donc être obtenu en culture aérobie de type fed-batch ou chemostat si le taux de croissance imposé n'excède pas une valeur seuil de l'ordre de $0.25\text{-}0.30 \text{ h}^{-1}$.

En métabolisme oxydatif l'oxygène est l'unique accepteur final d'électrons. La production d'énergie provient donc de la partie basse de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Le bilan énergétique de la dégradation du glucose en métabolisme oxydatif est donné par l'Equation 1.

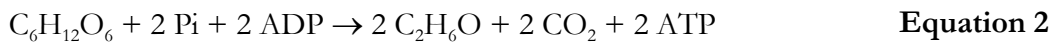


La balance redox est assurée par une ré-oxydation des co-facteurs NADH, H^+ et FADH, H^+ au niveau de la chaîne respiratoire.

La biomasse, le CO_2 et l'eau sont les seuls produits issus de la consommation de glucose et d'oxygène. Le rendement en biomasse est maximal et atteint $0.5 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ et le coefficient respiratoire est proche de 1 pour une croissance sur glucose (Verduyn et al., 1991).

1.1.2 Métabolisme fermentaire

Le métabolisme fermentaire pur est atteint en conditions d'anaérobiose. L'oxygène est absent et ne peut jouer le rôle d'accepteur final d'électrons. La production d'énergie provient donc de la partie basse de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la production d'éthanol. Le bilan énergétique de la dégradation du glucose en métabolisme fermentaire est donné par l'Equation 2 (la contribution du cycle de Krebs à la production d'énergie est négligée).



La production d'éthanol à partir de glucose est un procédé neutre du point de vue de la balance redox. La ré-oxydation des co-facteurs NADH, H^+ et FADH, H^+ générés par l'anabolisme est donc assurée par la synthèse de glycérol afin d'éviter un déséquilibre de la balance redox.

Le flux de carbone à travers le TCA est nettement diminué par rapport au métabolisme oxydatif (Jouhten et al., 2008; Nissen et al., 1997; Pagliardini, 2010) mais tout de même présent pour des contraintes anaboliques. Les co-facteurs mitochondriaux NADH, H^+ ne peuvent être ré-oxydés dans la mitochondrie et doivent emprunter des navettes de transport du pouvoir réducteur pour être oxydés dans le cytosol. En anaérobiose le cycle de Krebs est divisé en deux branches : une

branche oxydative du citrate au succinyl-CoA, une branche réductive de l'oxalo-acétate au succinate. Les co-facteurs FADH_2 ne sont théoriquement pas générés par le cycle de Krebs dans cette configuration mais au contraire ré-oxydés par l'action de l'enzyme fumarate reductase (Camarasa, 2003)

Le rendement en biomasse est diminué à environ $0.1 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ et des co-métabolites comme l'éthanol, le glycérol, l'acétate, le pyruvate et du succinate sont produits avec la biomasse et le CO_2 (Verduyn et al., 1990)

L'oxygène est également impliqué dans les réactions de synthèse d'acides gras et des stérols. En anaérobiose il faut donc apporter de l'ergostérol ou du tween pour que la synthèse de certaines de ces molécules puisse se produire (Visser et al., 1990)

1.1.3 Métabolisme oxydo-réductif

Un métabolisme dit oxydo-réductif est caractérisé par la production d'éthanol en aérobiose, c'est-à-dire par un fonctionnement simultanée de la chaîne respiratoire et de la réaction de production d'éthanol. Un métabolisme oxydo-réductif est mis en place en aérobiose si la valeur du flux glycolytique dépasse une valeur seuil.

L'oxygène et l'acétaldéhyde sont utilisés simultanément comme accepteurs d'électrons (Figure 2). La production d'énergie provient de la partie basse de la glycolyse, du cycle de Krebs et de la phosphorylation oxydative. Les cofacteurs réduits NADH , H^+ et FADH , H^+ sont ré-oxydés simultanément par la chaîne respiratoire et la production d'éthanol et éventuellement de glycérol.

Le flux de carbone à travers le TCA est plus faible que celui observé en métabolisme oxydatif pur mais plus élevé que celui observé en métabolisme fermentaire (Frick and Wittmann, 2005; Gombert et al., 2001). La valeur du coefficient respiratoire est supérieure à l'unité. La valeur du rendement en biomasse est inférieure à celle observée en métabolisme oxydatif et comprise entre 0.10 et $0.16 \text{ g}_X \cdot \text{g}_{\text{glucose}}^{-1}$ pour des valeurs de coefficient respiratoire comprises entre 12 et 6 respectivement (Franzén, 2003). Le rendement de production de glycérol est plus faible que celui observé en anaérobiose (Franzén, 2003).

1.2 Effet Crabtree

1.2.1 Répression catabolique

En 1929 Herbert Crabtree remarque que l'addition de glucose à une suspension de cellules tumorales de rat décroît leur activité respiratoire et augmente la production d'acide lactique (Crabtree, 1929). Par la suite l'effet Crabtree a été transposé à l'apparition de la fermentation

alcoolique chez la levure et a été défini de deux façons (Alexander and Jeffries, 1990). Une définition phénoménologique de l'effet Crabtree est l'existence d'une production d'alcool en aérobiose. De façon mécanistique l'effet Crabtree est défini comme l'inhibition de la respiration cellulaire par l'activité glycolytique et de production d'éthanol. Ces deux définitions ne sont pas forcément équivalentes : une levure peut produire de l'éthanol en conditions aérobies sans que son activité de respiration soit inhibée par la fermentation (Alexander and Jeffries, 1990). La définition mécanistique de l'effet Crabtree recoupe donc partiellement la définition de l'effet glucose (Carlson, 1999; Gancedo, 1998).

Le glucose est le substrat préférentiel de la levure *S. cerevisiae* et la présence d'une concentration non nulle en glucose a un impact négatif sur l'assimilation d'autres sucres et un impact positif sur l'assimilation du glucose, ce qui est défini comme l'effet glucose (Klein et al., 1998; Meijer et al., 1998). Cet effet glucose comprend i) un effet négatif ou positif du glucose sur la transcription de certains gènes cibles ii) une diminution / augmentation du turn-over des ARN de gènes cibles iii) une diminution / augmentation de l'efficacité de traduction de ces ARN iv) une diminution / augmentation du turn-over des peptides issus de la traduction de ces ARN v) une inhibition / stimulation ciblée de l'activité de ces peptides (Klein et al., 1998). La répression catabolique par le glucose correspond à un impact négatif du glucose sur l'expression de certains gènes et s'exerce via les trois premiers points. La répression catabolique par le glucose est donc comprise dans l'effet glucose (Klein et al., 1998). Les gènes dont l'expression est affectée négativement codent pour des peptides impliqués dans l'utilisation de sources de carbone alternatives au glucose (enzyme invertase codé par *SUC2*, gènes *MALT* codant pour un transporteur du maltose et *MALS* codant pour une enzyme d'hydrolyse du maltose), dans le cycle TCA (gène codant *CIT1* pour l'enzyme citrate synthase) ou encore dans la chaîne respiratoire (gène *QCR8* codant pour une sous-unité du cytochrome c) (Carlson, 1999; Gancedo, 1998; Klein et al., 1999; Van Maris et al., 2001).

La répression catabolique par le glucose est assurée par le biais de la protéine kinase Snf1 qui contrôle l'activation du répresseur Mig1p. Le fonctionnement de cette cascade métabolique est illustré sur la Figure 3. En présence de glucose l'activité kinase de Snf1 n'est pas présente en raison de l'interaction entre les deux domaines RD et KD. Le facteur Mig1 est alors localisé dans le noyau et peut se fixer au niveau d'une séquence consensus sur le promoteur de certains gènes cibles de la répression catabolique par le glucose (Gancedo, 1998) et y recruter le complexe Ss16-Tup1 empêchant ainsi la transcription de ce gène (Carlson, 1999). Au contraire en absence de

glucose le facteur Mig1 est phosphorylé par l'activité de Snf1 et passe alors dans le cytosol où il ne peut influencer sur l'expression des gènes.

Le signal à l'origine de l'activité kinase de Snf1 n'est toujours pas connu même si le rôle du ratio AMP : ATP (donc de la charge énergétique cellulaire) et de l'hexokinase PII (codée par HXK2) ont été souligné (Carlson, 1999). Le rôle de la protéine Mig1 peut être assuré également par la protéine Mig2p (Klein et al., 1999). Il est intéressant de noter que la protéine Mig1p peut exercer un double effet inhibiteur sur l'expression de gènes cibles : fixation sur le promoteur de ce gène et fixation sur le promoteur d'un gène codant pour un activateur de la transcription du gène cible (par exemple HAP4) (Klein et al., 1999).

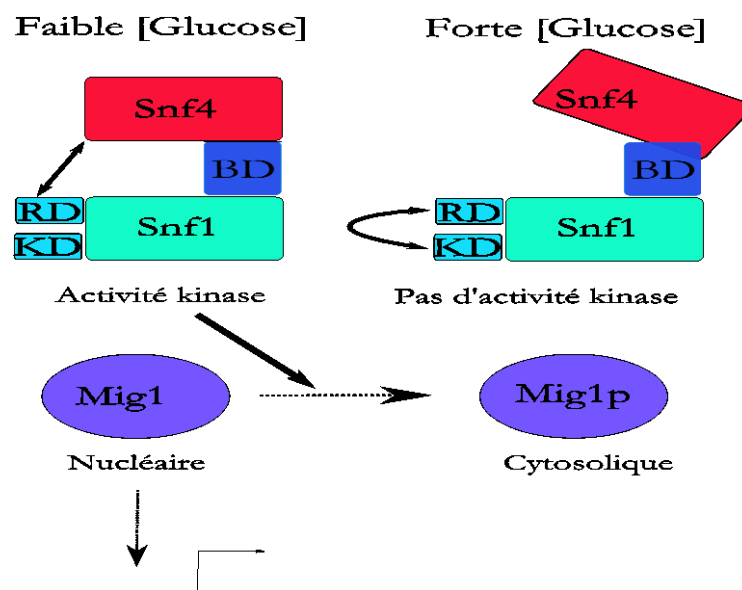


Figure 3. Effet de répression catabolique par le glucose chez *S. cerevisiae* d'après (Gancedo, 1998). RD : Regulatory domain, KD : catalytic domain, Snf : protéine kinase. Les flèches en trait plein illustrent des interactions, la flèche en trait pointillé indique un changement de localisation : Mig1 est nucléaire alors que Mig1p est cytosolique.

Chez *S. cerevisiae* l'effet Crabtree a d'abord été défini comme une répression de la respiration par le glucose menant à une activité de fermentation (De Deken, 1966). Cette définition a été confirmée par le fait que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène diminue en culture continue lorsque le taux de dilution excède le taux de dilution critique ($D_c = 0.24 \text{ h}^{-1}$) et que la levure passe d'un métabolisme oxydatif pur à un métabolisme oxydo-réductif (Von Meyenburg, 1969). De plus, la présence d'une concentration résiduelle en glucose élevée semble affecter l'activité de nombreuses enzymes impliquées dans le contrôle de réactions chimiques liées à la respiration (cytochrome c, succinate deshydrogénase) et au métabolisme mitochondrial (malate deshydrogénase, malate synthase, fumarase, citrate synthase) (Beck and Von Meyenburg, 1968; Fiechter et al., 1981). A la fin des années 70 l'effet Crabtree est donc assimilé à une répression catabolique et est donc confondu avec l'effet glucose.

1.2.2 Notion de capacité respiratoire limite

Les travaux de Bardford et de Petric (réalisés avec *S. uvarum*) ont permis de montrer qu'en culture continue aérobie la vitesse spécifique de consommation d'oxygène reste constante pour des taux de dilution supérieurs au taux de dilution critique (Barford and Hall, 1979; Petrik et al., 1983). Petrik introduit de plus la notion d'effet Crabtree « court-terme » et « long-terme » :

- Un effet « court-terme » est obtenue par un ajout pulsé de glucose dans une culture continue aérobie de *S. cerevisiae* stabilisée en métabolisme oxydatif. Cet ajout provoque une production immédiate d'éthanol sans diminution de la vitesse spécifique de respiration et sans que l'activité des cytochromes soit affectée (Petric et al., 1983).
- Un effet Crabtree « long-terme » peut être provoqué par une augmentation du taux de dilution au-delà du taux de dilution critique qui amène un nouveau régime permanent caractérisé par un métabolisme oxydo-réductif, une activité réduite des cytochromes sans que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène soit réduite.

La diminution de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène observée au-delà du D_c par Von Meyenburg semble liée à une limitation en manganèse (Rieger et al., 1983). L'existence de cette diminution est pourtant confirmée par plusieurs études ultérieures (van Hoek et al., 1998; Van Maris et al., 2001; Postma et al., 1989) et pourrait être liée à une répression de l'activité des enzymes du cycle de Krebs par une concentration en glucose élevée (Gancedo, 1992). Cette diminution pourrait aussi être liée à une durée d'adaptation insuffisante des cellules au fort taux de croissance. Il est en effet possible d'atteindre un régime permanent à $D = 0.45 \text{ h}^{-1}$ ($> D_c$) et avec une vitesse spécifique de consommation d'oxygène identique à celle obtenue au taux de dilution critique au bout d'un temps de culture élevé (plus de 50 temps de séjour) (Barford and Hall, 1979).

Rieger introduit le concept de capacité respiratoire limite pour expliquer que la transition d'un métabolisme oxydatif à un métabolisme oxydo-réductif se produit pour une même valeur de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène pour des milieux contenant du glucose et de l'éthanol en proportion variable (Rieger et al., 1983).

Ce concept de capacité respiratoire limite est ensuite développé par Sonnleitner et Käppeli et est toujours utilisé aujourd'hui pour expliquer l'effet Crabtree (Sonnleitner and Käppeli, 1986). La capacité respiratoire est définie comme un ensemble de voies métaboliques assurant la dégradation oxydative des substrats carbonés et comprend la voie de la Pyruvate Déshydrogénase, le cycle de Krebs, la chaîne respiratoire, les voies anaplérotiques, le by-pass de la

Pyruvate Deshydrogénase et le transport de l'Acétyl-CoA entre le cytosol et la mitochondrie (Féria-Gervasio, 2008).

Dans le cas d'une croissance sur glucose, si la valeur du flux glycolytique est inférieure à la valeur limite de capacité oxydative de la cellule, le métabolisme est oxydatif. Si la valeur du flux excède la capacité maximale de la cellule, la partie excédentaire du flux glycolytique est dirigée vers le métabolisme réductif et de l'éthanol est produit (Figure 4 A). Les mécanismes d'oxydation et de respiration co-existent alors, donnant lieu à un métabolisme de type oxydo-réductif (Sonnleitner and Käppeli, 1986).

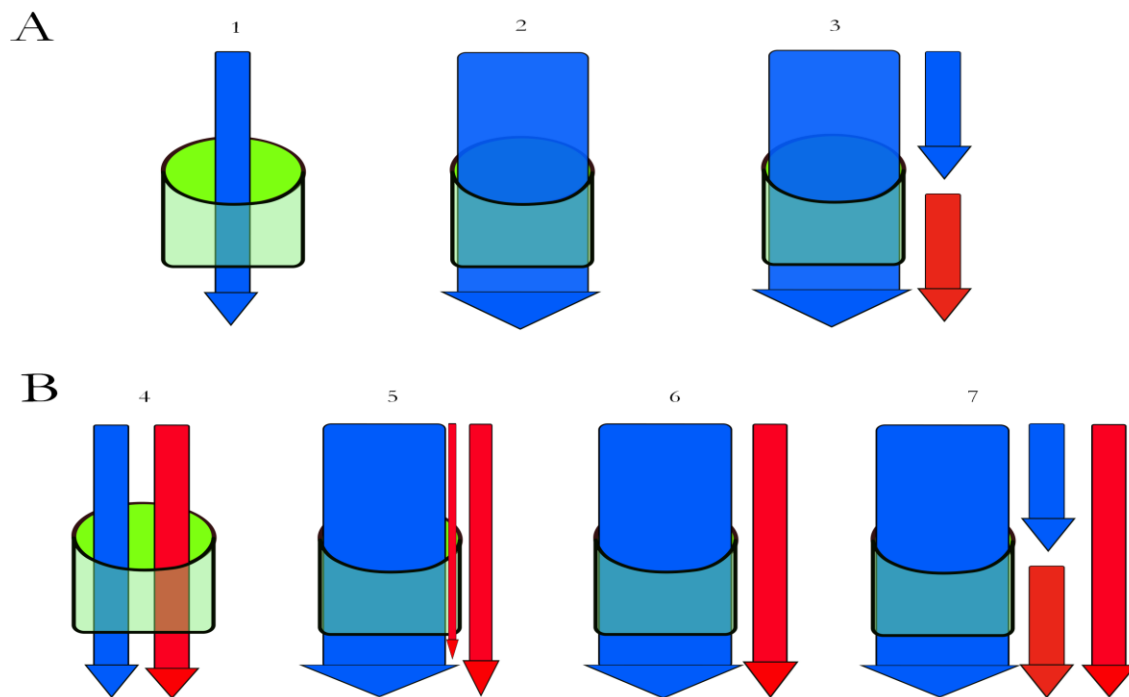


Figure 4. Existence d'une capacité respiratoire limite pour une croissance sur glucose chez *S. cerevisiae* d'après (Sonnleitner and Käppeli, 1986). Les flèches bleues représentent un flux de glucose, les flèches rouges un flux d'éthanol. **A :** cas du substrat glucose. 1 : le flux de glucose est sub-critique. 2 : le flux de glucose est critique. 3 : le flux de glucose est supra-critique et une partie du flux de glucose est donc métabolisé par la voie réductive ce qui donne lieu à la synthèse d'éthanol. **B :** cas d'un double substrat glucose et éthanol. 4 : les flux de glucose et d'éthanol sont sub-critiques. 5 : le flux de glucose est sub-critique et est métabolisé entièrement par la voie oxydative, une partie du flux d'éthanol ne peut être consommé par la voie oxydative et l'éthanol substrat s'accumule. 6 : le flux de glucose est critique, le flux d'éthanol ne peut plus être consommé par la voie oxydative et l'éthanol substrat s'accumule. 7 : le flux de glucose est supra-critique et une partie du flux de glucose est donc métabolisé par la voie réductive ce qui donne lieu à la synthèse d'éthanol, le flux d'éthanol substrat ne peut être consommé par la voie oxydative et l'éthanol substrat s'accumule.

Dans le cas d'une alimentation avec deux sources de carbone glucose et éthanol, les deux substrats peuvent être utilisés de façon oxydative si la valeur du flux de carbone est inférieure à la capacité maximale du métabolisme oxydatif (Figure 4 B). A partir d'une valeur seuil de flux carboné le glucose est utilisé préférentiellement par la cellule et l'éthanol n'est pas consommé

dans la mesure où il n'existe pas de mécanisme réductif pour la consommation d'éthanol. Si la valeur du flux glycolytique dépasse à son tour la capacité oxydative maximale, le flux glycolytique excédentaire est métabolisé par la mise en place d'un métabolisme réductif et donc la synthèse d'éthanol (Sonnleitner and Käppeli, 1986). Cette description s'appuie notamment sur des résultats obtenus en culture continue pour des solutions d'alimentation contenant des proportions variables de glucose et d'éthanol (Rieger et al., 1983).

Cette définition de la capacité respiratoire limite peut aussi expliquer la mise en place d'un métabolisme oxydo-réductif en cas de limitation soudaine en oxygène lors d'une culture continue en raison de la réduction de la capacité maximale de catabolisme oxydatif de la levure dans ces conditions (Sonnleitner and Käppeli, 1986).

La définition moderne et retenue de l'effet Crabtree est une définition phénoménologique : présence d'une production d'éthanol en aérobiose (Pronk et al., 1996). Il est classiquement admis que ce phénomène est lié à un mécanisme d'overflow de la capacité oxydative limite causant l'apparition d'un catabolisme réductif du substrat carboné parallèlement au catabolisme oxydatif (Sonnleitner and Käppeli, 1986).

Il semble que l'effet Crabtree puisse aussi être relié au transport du glucose dans la cellule. Il a ainsi été montré que le flux glycolytique est plus important chez les levures Crabtree positives comme *S. cerevisiae* que chez les levures Crabtree négatives comme *Candida utilis* en réponse à un ajout pulsé de glucose en culture continue (Van Urk et al., 1989). Cette différence dans les flux peut être reliée à une différence dans les mécanismes d'incorporation du glucose : transport facilité chez *S. cerevisiae* (donc non limité) et transport actif chez *Candida utilis* (donc potentiellement limitée par l'énergétique cellulaire).

Il est possible de distinguer deux types d'effet Crabtree qui diffèrent par la façon de les obtenir (Pronk et al., 1996) :

- Effet Crabtree court – terme : obtenu par exposition d'une culture limitée en glucose à un excès de glucose. L'excès de glucose minimum pour provoquer l'apparition de la fermentation éthanolique est d'environ 150 mg.L⁻¹ (Verduyn et al., 1984). Cette situation peut se présenter i) lors d'un ajout pulsé de glucose à une culture continue de la levure stabilisée à un taux de dilution inférieure au taux de dilution critique ii) lors d'une augmentation brusque du taux de dilution d'une culture continue limitée en glucose.
- Effet Crabtree long-terme : obtenu pour de forts taux de croissance quel que soit le mode de culture. Cette situation peut donc se présenter i) en culture batch ii) en culture continue pour des taux de dilution supérieurs au taux de dilution critique.

La notion de capacité respiratoire limite est cependant un concept de type boîte noire dans la mesure où la/les étape(s) limitante(s) à l'origine de la bascule n'a (ont) pas été déterminé(s) à ce jour.

1.2.3 Essais d'identification d'une étape limitant la capacité oxydative

1.2.3.1 Chaîne respiratoire

Les travaux de Rieger sur le déclenchement de l'effet Crabtree ont permis de mettre en évidence que la transition respiro-fermentaire pour la souche *S. cerevisiae* H1022 se produisait :

- pour une même vitesse spécifique de consommation de glucose q_{glucose} ($3.4 \text{ mmole.g}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$) et une même vitesse spécifique de consommation d'oxygène q_{O_2} ($8 \text{ mmole.g}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$) pour des milieux d'alimentation contenant différentes concentrations en glucose.
- pour une même vitesse spécifique de consommation d'oxygène q_{O_2} (proche de $8 \text{ mmole.g}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$) pour des milieux d'alimentation contenant différentes proportions glucose/éthanol.

Il a donc été suggéré que la transition respiro-fermentaire était provoquée par une capacité maximale de fonctionnement de la chaîne respiratoire de *S. cerevisiae*.

Cependant il a été rapporté que l'ajout d'acides faibles dans le milieu d'alimentation de cultures continues limitées en carbone de *S. cerevisiae* CBS 8066 provoquait une augmentation de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène au-delà de cette vitesse spécifique de respiration. La vitesse spécifique de consommation d'oxygène q_{O_2} atteinte pour un taux de dilution de 0.1 h^{-1} passe ainsi de $2.5 \text{ mmole.g}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$ en absence d'acide faible à $19.5 \text{ mmole.g}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$ lorsque 10 mM d'acide benzoïque est ajouté dans le milieu (Verduyn et al., 1992). La fermentation alcoolique est absente pour cette vitesse de respiration élevée alors que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène de cette souche atteint un maximum de $12.0 \text{ mmole.g}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$ au déclenchement de la production d'éthanol pour un taux de dilution de $D = 0.38 \text{ h}^{-1}$ (Postma et al., 1989).

De plus, il a été rapporté que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène d'une souche surexprimant l'enzyme Pyruvate Décarboxylase continue d'augmenter après le déclenchement de la transition respiro-fermentaire (van Hoek et al., 1998).

Enfin, la comparaison des vitesses spécifiques de consommation d'oxygène obtenus lors d'ajouts pulsés de glucose en cultures continues limitées en carbone de levures Crabtree positive et Crabtree négative n'a pas permis de montrer un lien entre les valeurs de ces vitesses et la présence de l'effet Crabtree (Van Urk et al., 1990)

La chaîne respiratoire ne semble donc pas être l'étape limitante de la capacité respiratoire et les études ultérieures se sont intéressées au devenir du carbone au niveau du nœud du pyruvate (Pronk et al., 1996).

1.2.3.2 Nœud du pyruvate et by-pass de la Pyruvate Déshydrogénase

Les travaux de Postma ont servi de base à une série d'études visant à déterminer et/ou modifier le devenir du carbone au niveau du nœud métabolique du pyruvate et du by-pass de la Pyruvate Déshydrogénase (PDH) (Postma et al., 1989). Plusieurs enzymes sont impliquées dans ces voies métaboliques (Tableau 4).

Tableau 4. Description des enzymes catalysant les voies métaboliques du nœud du pyruvate.

Enzyme	Localisation Structure	/ ORF	Co-facteurs
Pyruvate Carboxylase (EC 6.4.1.1)	Cytosolique (van Urk et al., 1989; Walker et al., 1991)	PYC 1 et PYC2 codent chacun pour une isoforme fonctionnelle.	Magnésium
Pyruvate décarboxylase (EC 4.1.1.1).	Cytosolique (van Urk et al., 1989)	PDC1, PDC5 et PDC6 codent chacun pour une isoforme fonctionnelle. PDC6 non exprimé sur glucose (Flikweert et al., 1996)	Magnésium
Pyruvate Déshydrogénase (EC 1.2.4.1+ EC 2.3.1.12+ EC 1.6.4.3)	Complexe enzymatique mitochondrial (van Urk et al., 1989) constitué de 4 sous-unités : E1 (α et β), E2, E3 et X (partagé avec alphacétoglutarate déshydrogénase) (Pronk et al., 1996).	PDA1 (E1 α) PDB1 (E1 β) LAT1 (E2) LPD1 (E3) PSX1 (X)	Thiamine pyrophosphate (ITP)
Acetyl-CoA Synthetase (EC 6.2.1.1)	Cytosolique (van den Berg et al., 1996)	ACS1 et ACS2	

Il a été montré que la constante d'affinité de l'enzyme PDH vis-à-vis du pyruvate ($K_m = 0.4$ mM) était plus faible que la constante d'affinité de l'enzyme Pyruvate Décarboxylase (PDC) vis-à-vis de ce substrat ($K_m = 6$ mM) (Postma et al., 1989). Pour de faibles flux glycolytiques le carbone empruntera préférentiellement la voie de la PDH au niveau du nœud du pyruvate (Postma et al., 1989; Pronk et al., 1996). Cette hypothèse a par la suite été confirmée expérimentalement (Pronk et al., 1994). Il faut toutefois remarquer que l'activité PDH est

mitochondriale alors que l'activité PDC est cytosolique : il ne peut y avoir de compétition directe entre ces deux activités car une étape de transport mitochondrial du pyruvate potentiellement limitante doit être considérée dans le cas de la PDH. Il a cependant été montré que l'affinité de mitochondries isolées de *S. cerevisiae* vis-à-vis du pyruvate était comparable à l'affinité de la PDH pour ce substrat, permettant ainsi de négliger l'étape de transport (van Urk et al., 1989). Pour de forts flux glycolytiques la voie de la PDH deviendrait saturée et le flux glycolytique emprunterait alors le by-pass de la PDH (Pronk et al., 1996). Cette hypothèse est cependant simplificatrice car i) il a été montré qu'une partie du flux de carbone était dirigé vers le by-pass de la PDH même pour de faibles flux glycolytiques afin de fournir l'Acétyl-CoA nécessaire aux réactions anaboliques (Flikweert et al., 1996) ii) le flux de carbone dirigé vers la réaction anaplérotique catalysée par l'enzyme cytosolique Pyruvate Carboxylase (PC) est négligée alors que la constante d'affinité de cette enzyme vis-à-vis du pyruvate est du même ordre de grandeur que celle de la PDH ($K_m = 0.8 \text{ mM}$) (Pronk et al., 1996).

Un second nœud de compétition entre voies métaboliques peut être identifié au niveau de l'acétaldéhyde qui peut être réduit en éthanol par l'Alcool Déshydrogénase ou oxydé en acétate par l'Acétaldéhyde Déshydrogénase. La constante d'affinité de l'Acétaldéhyde Déshydrogénase ($K_m = 6 \mu\text{M}$) pour l'acétaldéhyde est cependant plus faible que celle de l'Alcool Déshydrogénase ($K_m = 0.6 \text{ mM}$) causant donc une direction préférentielle du carbone vers l'acétate et l'Acétyl-CoA (Postma et al., 1989; Pronk et al., 1996).

Les travaux de Postma ont permis de montrer la relation entre le comportement métabolique de la levure et la compétition entre voies métaboliques au niveau de ces deux nœuds (Postma et al., 1989). Lors de cultures continues aérobies limitées en carbone de la souche *S. cerevisiae* CBS 8066 les zones suivantes peuvent être remarquées :

- Pour $D < 0.30 \text{ h}^{-1}$: métabolisme oxydatif pur, proportionnalité entre le taux de dilution et les vitesses spécifiques de respiration (q_{O_2} et q_{CO_2}).
- Pour $0.30 < D < 0.38 \text{ h}^{-1}$: métabolisme oxydatif, excrétion d'acétate et augmentation brusque des vitesses de respiration.
- Pour $D > 0.38 \text{ h}^{-1}$: métabolisme oxydo-réductif.

Ces comportements métaboliques ont été interprétés par rapport aux capacités des réactions impliquées dans le by-pass de la PDH :

- Pour $D < 0.27 \text{ h}^{-1}$: la capacité de la PDH ($\mu\text{mol.mg}_{\text{protein}}^{-1}.\text{min}^{-1}$) est inférieure aux capacités de l'Acétyl-CoA synthase et de l'Acétaldéhyde Déshydrogénase. Le flux de carbone passant par le by-pass de la PDH est canalisé préférentiellement vers l'acétate (en

raison des différences d'affinité pour l'acétaldéhyde entre l'Acétaldéhyde Déshydrogénase et l'Alcool Déshydrogénase) puis vers l'Acétyl-CoA utilisé ensuite dans l'anabolisme cytosolique.

- Pour $0.27 < D < 0.37 \text{ h}^{-1}$: la capacité de la PDH est supérieure à la capacité de l'Acétyl-CoA synthase mais inférieure à la capacité l'Acétaldéhyde Déshydrogénase. Le flux de carbone passant par le by-pass de la PDH est donc partiellement excrété sous forme d'acétate.
- Pour $D > 0.38 \text{ h}^{-1}$: la capacité de la PDH est supérieure aux capacités de l'Acétyl-CoA synthase et de l'Acétaldéhyde Déshydrogénase. Le flux de carbone passant par le by-pass de la PDH est partiellement excrété sous forme d'acétate et d'éthanol.

Ces hypothèses basées sur la connaissances des activités enzymatiques, des constantes d'affinité et de la concentration intracellulaire du pyruvate permettent de décrire de façon satisfaisante le comportement de la levure en culture réelle (Postma et al., 1989). Il convient cependant de rester prudent sur ces résultats d'activité *in vivo* déduits des résultats d'activité *in vitro*. Il serait à ce titre intéressant d'affiner les déterminations d'activité enzymatique à la lumière des connaissances récentes acquises sur les concentrations *in vivo* des co-facteurs métalliques notamment le magnésium (Bouwman et al., 2007; van Eunen et al., 2010). De plus, les résultats de calculs de flux métaboliques à partir de données obtenues en chemostat ne confirment pas ce phénomène de saturation des voies du by-pass de la PDH (Frick and Wittmann, 2005).

Les résultats rapportés par (Postma et al., 1989) ont néanmoins conduit à l'identification d'un taux de dilution sub-critique (apparition de l'excrétion d'acétate) inférieur au taux de dilution critique (production d'éthanol) (Guillou, 1996). L'augmentation brusque des vitesses de respiration à partir du taux de dilution sub-critique serait liée à un effet découplant de l'acétate excrété sur la chaîne respiratoire (Postma et al., 1989). Les calculs effectués de façon théorique par Verduyn montrent cependant que les concentrations en acétate atteintes ne permettent pas d'expliquer de façon quantitative l'effet observé sur les vitesses spécifiques de respiration (Verduyn, 1992).

A la suite de ces travaux de nombreuses études de génie génétique ont été réalisés dans les années 1990 pour identifier l'étape limitante à l'origine de la transition respiro-fermentaire au niveau du nœud du pyruvate ou du by-pass de la PDH. Ces travaux ont visé soit à diminuer le flux de carbone vers les voies fermentaires, soit à augmenter le flux de carbone vers les voies respiratoires. Pour cela l'impact de la suppression ou de la surexpression de gènes codant pour des enzymes impliquées dans les voies métaboliques du nœud du pyruvate sur le déclenchement

de l'effet Crabtree a été investigué. Ces travaux sont résumés dans le Tableau 5 et montrent que ces tentatives ne permettent pas d'identifier une étape limitante parmi les activités enzymatiques investiguées.

Tableau 5. Travaux de génie génétique sur les gènes codant pour les enzymes catalysant les réactions impliquées au niveau du noeud du pyruvate.

Enzyme	Modification génétique et mode opératoire	Résultats	Référence
PC	Souche CEN.PK 113-7D Δ PYC1 Δ PYC2 + remplacement par gène <i>ppc</i> codant pour enzyme PEP carboxylase d' <i>Escherichia coli</i> . Surexpression de PYC2 Ajout pulsé de glucose en culture continue	Pas de modification de l'excrétion de co-produits fermentaires par rapport à la souche sauvage.	(Bauer et al., 1999)
PDC	Souche T2-3D issue de CBS8066 Δ PDC1, Δ PDC5, Δ PDC6 Ajout pulsé de glucose en culture continue.	Absence de production d'éthanol pour la souche modifiée Production importante de pyruvate et faible augmentation du flux glycolytique pour la souche modifiée par rapport à la souche sauvage.	(Flikweert et al., 1997)
	Souche CEN.PK 113-7D Surexpression de PDC par un plasmide multi-copies. Cultures continues limitées en carbone à différents taux de dilution.	Augmentation de l'activité de la PDC d'un facteur 14 pour la souche modifiée. Fardeau métabolique lié à synthèse PDC cause réduction taux de croissance en culture discontinue mais pas de réduction du rendement en biomasse en culture continue. Réduction du taux de croissance critique de $D = 0.30 \text{ h}^{-1}$ pour la souche sauvage à $D = 0.25 \text{ h}^{-1}$ pour la souche modifiée.	(van Hoek et al., 1998)
PDH	Souche T2-3D issue de CBS8066 Δ PDA1 + remplacement par le gène procaryotique Tn5ble = abolition de l'activité PDH.	Croissance possible sur glucose mais réduction du rendement en biomasse de 15% et réduction de Y_{ATP} de 16 à $14.4 \text{ g}_X \cdot \text{mole}_{\text{ATP}}^{-1}$ car le by pass de la PDH consomme de l'ATP.	(Pronk et al., 1994)
ACS	Souche CEN.PK 113-7D Surexpression de ACS1 et ACS2 par un plasmide multi-copies. Ajout pulsé de glucose en culture continue.	Pas de modification de la production d'éthanol pour ACS1 ⁺ ni ACS2 ⁺ . Augmentation de la production d'acétate pour ACS1 ⁺ , pas de modification pour ACS2 ⁺ .	(De Jong-Gubbels et al., 1998)

1.2.4 Modulateurs globaux

Les échecs pour l'identification d'une réaction limitante provoquant la transition respiro-fermentaire ont conduit à investiguer l'effet des régulateurs globaux contrôlant l'expression des gènes qui pour les enzymes impliquées dans les voies métaboliques impliquées dans l'effet Crabtree (Blom et al., 2000). En effet, le contrôle du flux de carbone à travers une voie métabolique est rarement réalisé par une enzyme seul mais plutôt assuré par une partie ou l'ensemble des enzymes de cette voie (Pronk et al., 1996).

1.2.4.1 Mig1 / Mig2

Une première approche de ce type a été réalisée par la suppression du gène MIG1 et / ou du gène MIG2 codant pour les protéines MIG1 et MIG2 qui sont impliquées dans la cascade de répression catabolique par le glucose (chapitre 1.2.1). Cette suppression avait pour but de supprimer la répression catabolique exercée par le glucose et donc i) de favoriser le catabolisme respiratoire du glucose ii) de permettre l'utilisation simultanée d'autres sources de carbone afin d'augmenter le rendement et la productivité de cultures de levure (Klein et al., 1999).

La suppression des gènes MIG1 et MIG2 dans la souche CEN.PK 113-7D a ainsi permis d'augmenter le taux de croissance observé lors d'une culture batch aérobie de 12% par rapport à la souche sauvage (Klein et al., 1999). Cette augmentation a été liée à une augmentation du catabolisme respiratoire du glucose dans la mesure où le taux de dilution critique est augmenté de 0.262 h^{-1} à 0.274 h^{-1} dans la souche mutée par rapport à la souche sauvage. La levée d'une répression par le glucose par la suppression des protéines médiatrices de cet effet (Mig1p et Mig2p) entraînerait donc une expression accrue de gènes impliqués dans le métabolisme respiratoire et donc une augmentation de la capacité respiratoire (Klein et al., 1999).

De plus, dans le cas de cultures batch en présence des sources de carbone glucose et saccharose, il a été observé une co-consommation de ces deux sucres pour la souche mutante alors que la consommation de saccharose avait lieu après la consommation de glucose pour la souche sauvage (Klein et al., 1999). Ce résultat est lié à la levée de l'inhibition de l'expression du gène SUC2 codant pour l'enzyme invertase permettant l'utilisation du saccharose.

Des résultats contradictoires ont été rapportés pour l'influence de la suppression de MIG 1 sur le taux de dilution critique (Cortassa and Aon, 1998). Il est décrit que le taux de dilution critique passe de 0.20 h^{-1} à 0.17 h^{-1} pour la souche par rapport à la souche sauvage CEN.PK 122. Néanmoins le faible taux de dilution critique atteint par la souche sauvage et le faible rendement en biomasse incite à suspecter l'existence d'une carence nutritionnelle.

1.2.4.2 Hap4p

Le complexe Hap2/3/4/5 se fixe sur une séquence consensus dans le promoteur de gènes cibles et en favorise la transcription et donc l'expression (Forsburg and Guarente, 1989). Les gènes dont l'expression est favorisée interviennent dans le métabolisme mitochondrial et notamment dans le cycle de Krebs et la chaîne respiratoire (Forsburg and Guarente, 1989; Lascaris et al., 2002). Les sous-unités Hap2p, Hap3p et Hap5p sont exprimés de façon constitutive (Blom et al., 2000; Forsburg and Guarente, 1989) alors que l'expression du gène HAP4 semble soumis à la répression catabolique par le glucose (DeRisi, 1997). Cette répression n'a jamais été prouvée expérimentalement mais est admise (Raghevendran et al., 2006). Le peptide Hap4p est donc la partie régulatrice du complexe Hap2/3/4/5.

Le gène HAP4 a été surexprimé dans plusieurs études afin d'augmenter l'expression des gènes codant pour des protéines impliquées dans la capacité respiratoire de *S. cerevisiae*, en présence ou en absence d'une répression catabolique par le glucose (Blom et al., 2000; Van Maris et al., 2001). Des résultats prometteurs ont été obtenus en cultures batch aérobie (donc en présence d'une répression par le glucose) de la souche DL1 comportant un plasmide pour la surexpression de HAP4 (Blom et al., 2000). Une augmentation du taux de croissance de 0.17 h^{-1} à 0.20 h^{-1} est observée pour la souche sur-exprimant HAP4 par rapport à la souche sauvage, ainsi qu'une réduction de 15% de la vitesse spécifique de production d'éthanol.

Ces résultats n'ont cependant pas été confirmés lors de cultures similaires de la souche 436 GH construite par intégration chromosomique du gène HAP4 dans le génome de la souche prototrophe CEN.PK 113-7D (Van Maris et al., 2001). Aucune différence n'est constatée dans le comportement de la souche sur-exprimant HAP4 par rapport à la souche sauvage en culture batch. Un effet positif sur le taux de dilution critique d'apparition de la fermentation éthanolique en culture continue limitée en carbone est constaté dans la mesure où ce seuil passe de 0.30 h^{-1} pour la souche sauvage à 0.33 h^{-1} pour la souche 436 GH. Cet impact positif est confirmé par une synthèse d'éthanol plus faible de la souche mutée par rapport à la souche sauvage lors d'un ajout pulsé de glucose en culture continue. De façon surprenante un effet positif marqué de la surexpression de HAP4 est obtenu en culture continue limitée par l'apport d'azote alors même que la concentration résiduelle en glucose n'est pas nulle et qu'aucune différence n'était attendue (similaire aux cultures batch). Cet effet positif se traduit notamment par une augmentation du rendement en biomasse par rapport au carbone. Il a été suggéré que cet effet est lié à la stimulation de l'expression de gènes codant pour des composés de la chaîne respiratoire et situés dans le génome mitochondrial. Cette stimulation des gènes mitochondriaux serait absente en

culture batch et expliquerait l'absence de différence phénotypique entre la souche sauvage et la souche mutée lors de ces expérimentations.

Il est intéressant de constater qu'une partie de l'effet positif de la suppression de Mig 1 et Mig 2 est sans doute liée à une expression accrue de HAP4 dans la mesure où la répression catabolique de l'expression de ce gène est levée dans le cas d'un double mutant Δ MIG1 Δ MIG2 (Klein et al., 1999).

La surexpression du gène HAP4 dans un mutant avec une suppression du gène MIG1 a fait l'objet d'une étude (Lascaris, 2004). Contrairement aux résultats attendus la souche mutée ne montre pas une expression accrue des gènes impliqués dans la capacité respiratoire par rapport à une souche présentant une simple surexpression de HAP4. Au contraire l'expression de ces gènes (par exemple SUC2 codant pour l'enzyme invertase) est réprimée dans une souche HAP4 \uparrow - Δ MIG1. Ces résultats inattendus montrent la complexité de l'effet de répression catabolique du glucose.

Il a été observé que le taux de dilution critique d'un mutant Δ HAP4 est inférieur au taux de dilution critique obtenue pour la souche sauvage (0.08 h⁻¹ contre 0.3 h⁻¹) alors même qu'un métabolisme purement oxydatif de la souche mutée peut être obtenu pour un taux de dilution de 0.05 h⁻¹ (Raghevendran et al., 2006). Ces résultats démontrent que le facteur Hap4p n'est pas indispensable pour l'activation de l'expression des gènes impliqués dans le catabolisme respiratoire à faible taux glycolytique mais le deviendrait pour des flux plus élevés. De plus Hap4p ne semble pas être la seule voie permettant l'activation de l'expression des gènes de la capacité respiratoire (Raghevendran et al., 2006).

1.2.4.3 Modification de la balance redox cytosolique

Les co-enzymes NAD⁺/NADH, H⁺ et NADP⁺/NADPH, H⁺ sont impliquées dans de nombreuses réactions métaboliques. La modification de leurs concentrations et /ou du ratio forme oxydée / forme réduite peut donc avoir des conséquences importantes sur le métabolisme de *S. cerevisiae* et semble notamment avoir des effets sur la transition respiro-fermentaire (Agrimi et al., 2011; Hou et al., 2009; Hou et al., 2010; Moreira dos Santos et al., 2003; Moreira dos Santos et al., 2004; Vemuri et al., 2007). Plusieurs tentatives de modification de ces paramètres ont permis d'améliorer les connaissances sur leur impact sur le déclenchement de l'effet Crabtree.

Peu d'études ont été consacrées à l'impact du co-enzyme NADP⁺/NADPH, H⁺ sur la balance respiro-fermentaire (Moreira dos Santos et al., 2003; Moreira dos Santos et al., 2004). Le gène codant pour l'enzyme NADPH₂ dépendante glutamate déshydrogénase a été supprimé (Δ GDH1)

et remplacé par d'autres systèmes NADH, H^+ dépendants (Δ GDH1 PGKp - GDH2 ou Δ GDH1 PGKp- GLT1 PGKp- GLN1) (Moreira dos Santos et al., 2003). Les résultats montrent que le taux de dilution critique des souches mutantes est inférieur au taux de dilution critique de la souche sauvage. La suppression du flux de consommation de NADPH, H^+ par l'enzyme glutamate déshydrogénase entraînerait un besoin en NADPH, H^+ plus faible et donc une diminution du flux vers le PPP. Le flux glycolytique serait alors plus important que pour la souche sauvage à taux de croissance identique, ce qui entraînerait une bascule anticipée (Moreira dos Santos et al., 2003). Une autre approche a consisté à augmenter le ratio $NAD^+/NADH, H^+$ dans les compartiments cytosolique et mitochondrial par l'introduction d'une réaction de formation de NADPH, H^+ à partir de NADH, H^+ i) dans la mitochondrie par surexpression du gène MAE1 codant pour l'isoforme mitochondrial de l'enzyme malique (Boles et al., 1998) ii) dans le cytosol par surexpression du gène sMAE1 codant pour un isoforme cytosolique de l'enzyme malique (Moreira dos Santos et al., 2004). Les résultats montrent une diminution majeure du taux de dilution critique pour la souche présentant le shunt mitochondrial (MAE1) par rapport à la souche sauvage ($0.19\ h^{-1}$ contre $0.35\ h^{-1}$), non observé pour la souche présentant le shunt cytosolique (sMAE1). Aucune explication mécanistique n'est cependant proposée par les auteurs (Moreira dos Santos et al., 2004).

Plusieurs études ont été consacrées à la modification du ratio $NAD^+/NADH, H^+$ pour impacter la transition respiration-fermentaire. En effet la capacité respiratoire limite pourrait être liée à une capacité limite de ré-oxydation par la chaîne respiratoire du NADH, H^+ généré dans le cytosol par la glycolyse et les réactions anaboliques (Flikweert et al., 1997). En effet suite à un ajout pulsé de glucose en culture continue le flux glycolytique observé pour une souche Δ PDC1 est plus faible que le flux observé chez la souche sauvage (Flikweert et al., 1997). Ce résultat suggère une limitation de la capacité de re-oxydation du $NAD^+/NADH, H^+$ cytosolique pour la souche mutée dans la mesure où il n'est plus possible d'utiliser le by-pass de la pyruvate déshydrogénase et la synthèse d'éthanol (Flikweert et al., 1997). Il a donc été suggéré par la suite qu'un excès de production de NADH, H^+ cytosolique par rapport à la capacité de ré-oxydation de la chaîne respiratoire causait une production d'éthanol et donc une augmentation du flux glycolytique afin d'assurer un apport d'énergie suffisant (la synthèse d'ATP lors de l'oxydation du NADH, H^+ est 8 fois inférieure pour la production d'éthanol par rapport à la chaîne respiratoire) (Vemuri et al., 2007; Vemuri, 2007). Une modification de la capacité de ré-oxydation du NADH, H^+ cytosolique pourrait donc impacter positivement la capacité respiratoire limite.

Une première approche a consisté à introduire des réactions supplémentaires consommatrices de NADH, H^+ afin de diminuer la concentration de ce co-facteur dans le cytosol (Heux et al., 2006; Hou et al., 2009; Vemuri et al., 2007) et dans la mitochondrie (Hou et al., 2009). L'introduction d'une NADH, H^+ oxydase cytosolique de *Lactobacillus lactis* diminue la concentration cellulaire en NADH, H^+ et diminue le rendement en éthanol (Heux et al., 2006). L'introduction d'une NADH, H^+ oxydase cytosolique de *Streptococcus pneumoniae* ou d'une NADH, H^+ kinase cytosolique ne modifie cependant pas le taux de dilution critique (Hou et al., 2009; Vemuri et al., 2007). En revanche l'introduction d'une NADH, H^+ déshydrogénase alternative mitochondriale ou d'une NADH, H^+ kinase mitochondriale repoussent la transition respiro-fermentaire de 0.27 à 0.32 h^{-1} et de 0.21 à 0.24 h^{-1} respectivement (Hou et al., 2009; Vemuri et al., 2007). Ainsi la réoxydation des cofacteurs NADH, H^+ cytosolique ne semble pas limitante dans la transition respiro-fermentaire mais la réoxydation des cofacteurs NADH, H^+ mitochondriaux pourrait l'être. La capacité de réoxydation supplémentaire des cofacteurs NADH, H^+ correspond alors à une augmentation de la capacité respiratoire.

Une seconde approche a consisté à diminuer le ratio $NAD^+/NADH, H^+$ dans les compartiments cytosolique et mitochondrial par introduction d'une enzyme Formate déshydrogénase permettant un apport de pouvoir réducteur NADH, H^+ supplémentaire par métabolisation du formate (Hou et al., 2010). Il a été montré que l'augmentation de la concentration en NADH, H^+ dans le compartiment mitochondrial provoque une excrétion d'éthanol non observée dans le témoin. Les auteurs attribuent ce phénomène à une inhibition du fonctionnement du cycle de Krebs par le NADH, H^+ , en particulier le complexe Succinate déshydrogénase.

Le rôle de la balance redox $NAD^+/NADH, H^+$ dans le déclenchement de l'effet Crabtree a été illustré récemment (Agrimi et al., 2011). Une diminution du taux de croissance critique est observée pour un mutant présentant une double suppression des transporteurs mitochondriaux du NAD^+ ($\Delta NDT1 \Delta NDT2$) ou une surexpression de l'un de ces transporteurs (NDT1) par rapport à la souche sauvage (0.25 contre 0.3 h^{-1}). Dans les deux cas une modification du ratio $NAD^+/NADH, H^+$ mitochondrial est observé par rapport à la souche sauvage (diminution pour $\Delta NDT1 \Delta NDT2$, augmentation pour NDT1). Cependant les vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de substrat à la bascule métabolique sont identiques ce qui suggère que le ratio $NAD^+/NADH, H^+$ mitochondrial n'est pas responsable du déclenchement de la transition respiro-fermentaire.

1.2.4.4 Autres effecteurs de la transition respiro-fermentaire

L'utilisation d'acide oléique comme co-substrat en culture continue a permis de retarder l'apparition d'éthanol lors d'un ajouté pulsé de glucose (Feria-Gervasio et al., 2008) et d'augmenter le taux de dilution critique de 0.24 à 0.26 h⁻¹ en accélérostat (Marc et al., 2013). Il a enfin été rapporté une diminution du taux de dilution critique observé en chemostat pour la souche *S. cerevisiae* Y41 de 0.13 à 0.10h⁻¹ environ quand la concentration en NaCl dans le milieu passe de 0 à 0.9 M (Olz et al., 1993). La pression osmotique créée par la concentration en NaCl pourrait donc impacter la transition respiro-fermentaire.

1.2.5 Identification des paramètres caractéristiques du shift oxydo-fermentaire

En culture continue, en accélérostat ou en productostat la transition respiro-fermentaire se produit lorsque la valeur du taux de dilution atteint une valeur seuil nommée taux de dilution critique. La valeur de ce seuil et les paramètres de la culture au moment de la transition ont été rapportés dans plusieurs études. Ces valeurs peuvent varier dans une gamme très large lorsque sont utilisées des souches mutées pour des gènes potentiellement impliquées dans la transition respiro-fermentaire. Les valeurs caractéristiques de la bascule métabolique sont rapportées dans le Tableau 6 pour les souches sauvages et dans le Tableau 7 pour les souches mutées.

La comparaison de ces études montre que la valeur du taux de dilution de critique de transition vers un métabolisme oxydo-réductif est fortement dépendante de la souche (Tableau 6). Ainsi la souche CBS 8066 a un taux de dilution critique de 0.34-0.38 h⁻¹ (van Dijken et al., 2000; Postma et al., 1989) ce qui est plus élevé que le taux de 0.25-0.30 h⁻¹ relevé pour la souche CEN.PK 113-7D (van Dijken et al., 2000; van Hoek et al., 1998; Van Maris et al., 2001; Vemuri et al., 2007). Cela est corrélé avec la vitesse spécifique maximale de consommation d'oxygène qui est plus élevée pour CBS 8066 comparée à CEN.PK 113-7D (12 contre 8 mmole.g_x⁻¹.h⁻¹ environ).

De plus, pour une même souche le taux de dilution peut varier en fonction de la conduite adoptée (Tableau 6). Ainsi pour la souche CEN.PK 113-7D on remarque que le taux de dilution critique déterminé en chemostat est de 0.28-0.30 h⁻¹ (Agrimi et al., 2011; Bauer et al., 1999; Van Maris et al., 2001; Overkamp et al., 2000) alors qu'une conduite en accélérostat donne une valeur de 0.25-0.27 h⁻¹ (van Dijken et al., 2000; Klein et al., 1999; Marc et al., 2013). Il semble donc qu'une conduite en accélérostat et une conduite en chemostat donnent des résultats différents pour le taux de dilution critique contrairement à ce qui est affirmé par (Klein et al., 1999). Cette différence pourrait être liée à une valeur du taux d'accroissement du taux de dilution trop élevée

(van der Sluis et al., 2001). La conduite en productostat conduit à une variabilité importante de la valeur du taux de dilution critique pour la souche CEN.PK 113-7D / CEN.PK 113-5D : 0.35 h^{-1} (Moreira dos Santos et al., 2003; Moreira dos Santos et al., 2004), 0.30 h^{-1} (Raghevendran et al., 2006) et 0.29 h^{-1} (Vemuri et al., 2007). De plus, certaines des valeurs rapportées du taux de dilution sont proches du taux de croissance maximal mais aucune explication n'est cependant proposée par les auteurs. Les valeurs de D_c plus élevées que celles obtenues en chemostat et accélérostat semblent liées à un seuil de détection insuffisamment élevé du capteur permettant la quantification de l'éthanol en phase liquide (Moreira dos Santos et al., 2003).

Ensuite, il est intéressant de remarquer que dans le cas d'une surexpression du gène codant pour l'enzyme Pyruvate Carboxylase (Bauer et al., 1999), dans le cas d'une double suppression des gènes codant pour les NADH déshydrogénases externe Nde1p et Nde2p (Overkamp et al., 2000) et dans le cas d'une suppression du gène codant pour la protéine Snf1 ou du gène codant pour la protéine Snf4 (Cortassa and Aon, 1998), la vitesse spécifique maximale de consommation d'oxygène est atteinte après la transition respiro-fermentaire. Aucune explication n'est cependant proposée pas les auteurs.

Enfin, il faut noter que peu d'études présentent une caractérisation fine de la transition respiro-fermentaire en reportant les vitesses spécifiques atteintes au moment de la bascule métabolique (Barford and Hall, 1979; Daran-Lapujade et al., 2009; van Hoek et al., 1998; Marc et al., 2013; Von Meyenburg, 1969; Overkamp et al., 2000; Postma et al., 1989; Rieger et al., 1983).

Tableau 6. Détermination du taux de dilution critique en chemostat, accélérostat ou productostat pour les souches sauvages de *S. cerevisiae*.

Souche	Modification génétique	Conduite	D_c (h^{-1})	qO_2 ($mmole.g_x^{-1}.h^{-1}$)	$q_{glucose}$ ($mmole.g_x^{-1}.h^{-1}$)	Référence
LBGH1022	Non	Chemostat	0.24	7.60	3.1	(Von Meyenburg, 1969)
248UNSW 703100	Non	Chemostat	0.31	12.5 -14.5	Non précisé	(Barford and Hall, 1979)
H1022	Non	Chemostat	0.30	8.1	3.45	(Rieger et al., 1983)
CBS 8066	Non	Chemostat	0.38	12	Non précisé	(Postma et al., 1989)
Y41	Non	Chemostat	0.13	Non précisé	Non précisé	(Olz et al., 1993)
Y41	Pas de modifications génétiques. Présence de 0.9 M NaCl.	Chemostat	0.10	Non précisé	Non précisé	
CEN.PK 113-7D	Non	Chemostat	0.30	Non précisé	Non précisé	(Overkamp et al., 2000)
CEN.PK 113-7D	Non	Chemostat	0.30	8.8	Non précisé	(van Hoek et al., 1998)
CEN.PK 113-7D	Non	Chemostat	$0.28 < D_c < 0.30$	Non précisé	Non précisé	(Bauer et al., 1999)
CEN.PK 113-7D	Non	Chemostat	0.30	8.6	Non précisé	(Van Maris et al., 2001)
CEN.PK 113-7D	Non	Chemostat	0.28	Non précisé	4.0	(Agrimi et al., 2011)
ALKO743	Non	Accelero-stat $\alpha = 0.010 h^{-2}$	0.25	6-9	3	(Paalme et al., 1997)
CEN.PK 113-7D	Non	Accélérostat $\alpha = 0.005 h^{-2}$	0.262	7.2-8.1 pour $0.25 < D < 0.28$	Non précisé	(Klein et al., 1999)
CBS 8066	Non	Accélérostat	0.34	Non précisé	Non précisé	(van Dijken et

Souche	Modification génétique	Conduite	D_c (h^{-1})	qO_2 ($mmole.g_x^{-1}.h^{-1}$)	$q_{glucose}$ ($mmole.g_x^{-1}.h^{-1}$)	Référence
CEN.PK 122	Non	$\alpha = 0.005 h^{-2}$ Accélérostat	0.27	Non précisé	Non précisé	al., 2000)
BAY.17	Non	$\alpha = 0.005 h^{-2}$ Accélérostat	0.32	Non précisé	Non précisé	
X2180	Non	$\alpha = 0.005 h^{-2}$ Accélérostat	0.22	Non précisé	Non précisé	
CEN.PK 113-7D	Non	$\alpha = 0.005 h^{-2}$ Accélérostat	0.25	6.96	3.00	(Marc et al., 2013)
CEN.PK 113-7D	Pas de modifications génétiques. d'oléate.	Présence $\alpha = 0.005 h^{-2}$ Accélérostat	0.26	6.94	2.66	
CEN.PK 113-7D	Non	Productostat	0.350 ± 0.004	Non précisé	Non précisé	(Moreira dos Santos et al., 2003)
CEN.PK 113-7D	Non	Productostat	0.35 ± 0.004	Non précisé	Non précisé	(Moreira dos Santos et al., 2004)
CEN.PK 113-7D	Non	Productostat	0.3	Non précisé	Non précisé	(Raghevendran et al., 2006)

Tableau 7. Détermination du taux de dilution critique en chemostat, accélérostat ou productostat pour les souches mutées de *S. cerevisiae*.

Souche	Modification génétique	Conduite	D_c (h^{-1})	qO_2 ($mmole.g_x^{-1}.h^{-1}$)	$q_{glucose}$ ($mmole.g_x^{-1}.h^{-1}$)	Référence
CG393 (hôte CEN.PK 113-5D)	Plasmide multi-copie avec surexpression de PDC1	Chemostat	0.23	8.6 (atteint pour $D = 0.25h^{-1}$)	Non précisé	(van Hoek et al., 1998)
CEN.JB28 0.25	$\Delta PYC1, \Delta PYC2$ + ppc d' <i>E.coli</i>	Chemostat	$0.25 < D_c < 0.30$	Non précisé	Non précisé	(Bauer et al., 1999)
CEN.JB27 0.23	Plasmide multi-copie avec surexpression de PYC2	Chemostat	$0.23 < D_c < 0.25$	Non précisé	Non précisé	
T475	$\Delta MIG1 \Delta MIG2$	Accélérostat $\alpha = 0.005 h^{-2}$	0.274	8.3-9.4 pour $0.25 < D < 0.28$	Non précisé	(Klein et al., 1999)
CEN.PK152	$\Delta NDE1 \Delta NDE2$	Chemostat	0.30	8.8	Non précisé	(Overkamp et al., 2000)
CEN.PK225-1B	$\Delta GUT2$	Chemostat	0.23	6.66	Non précisé	
CEN.PK263-5D	$\Delta NDE1 \Delta NDE2 \Delta GUT2$	Chemostat	0.20	7.29 (atteint pour $D = 0.30 h^{-1}$)	Non précisé	
436GH (hôte CEN.PK 113-7D)	Surexpression de HAP4	Chemostat	0.33	8.5	Non précisé	(Van Maris et al., 2001)
CEN.MS6-1A	$\Delta GLR1$	Productostat	0.316 ± 0.002	Non précisé	Non précisé	(Moreira dos Santos et al., 2003)
CEN.PK448	$\Delta GDH1$	Productostat	0.247 ± 0.007	Non précisé	Non précisé	
CEN.MS1-10C T1	$\Delta GDH1$ PGKp - GDH2	Productostat	0.217 ± 0.002	Non précisé	Non précisé	
CEN.MS5-3A	$\Delta GDH1$ PGKp- GLT1 PGKp- GLN1	Productostat	0.211 ± 0.002	Non précisé	Non précisé	
CEN.MS13-2A	Surexpression de PYC2 et MAE1	Productostat	0.190 ± 0.004	Non précisé	Non précisé	(Moreira dos Santos et al., 2004)
CEN.MS14-1C	Surexpression de PYC2 et sMAE1	Productostat	0.344 ± 0.003	Non précisé	Non précisé	
CEN.PK 517-1A	$\Delta HAP4$	Productostat	0.083	Non précisé	Non précisé	(Raghevedran

Souche	Modification génétique	Conduite	D_c (h^{-1})	qO_2 ($mmole.g_x^{-1}.h^{-1}$)	$q_{glucose}$ ($mmole.g_x^{-1}.h^{-1}$)	Référence
CEN.PK 113-5D	pYX212	Productostat	0.29 ± 0.01	Non précisé	Non précisé	et al., 2006) (Vemuri et al., 2007)
NOX (hôte CEN.PK 113-5D)	pYX212-NOX	Productostat	0.27 ± 0.02	Non précisé	Non précisé	
AOX (hôte CEN.PK 113-5D)	pYX212-AOX	Productostat	0.32 ± 0.007	Non précisé	Non précisé	
ndt1 Δ ndt2 Δ	Δ NDT11 Δ NDT2	Chemostat	≈ 0.28	Non précisé	4.0	(Agrimi et al., 2011)
ndt1-over	Surexpression de NDT1	Chemostat	≈ 0.27	Non précisé	4.0	

1.3 Impact du dioxyde de carbone sur la physiologie de *S. cerevisiae*

1.3.1 Implication du dioxyde de carbone dans le métabolisme de *S. cerevisiae*

1.3.1.1 Anabolisme et catabolisme

Le dioxyde de carbone est impliqué dans le métabolisme microbien sous sa forme dissoute ou sous la forme d'ions hydrogénocarbonates impliqués dans des équilibres dynamiques avec le CO₂d.

Le CO₂d intervient comme produit dans 47 réactions du métabolisme de *S. cerevisiae* (Genomes, Pathways,). Cette production peut résulter :

- d'une réaction catabolique d'oxydo-réduction amenant à la synthèse d'un co-facteur réduit NADH₂ comme par exemple la réaction catalysée par l'enzyme pyruvate dehydrogénase ou les réactions du cycle de Krebs (isocitrate \rightleftharpoons alpha- cétooglutarate + 2H⁺ + CO₂ \rightleftharpoons succinyl-CoA + 2H⁺ + CO₂) et la production de 6 Phospho-Gluconate à partir de Ribulose-5-Phosphate dans la voie des Pentoses Phosphates.

- d'une décarboxylation liée à la condensation ou au clivage d'intermédiaires métaboliques. Les voies anaboliques concernées sont les voies de synthèse de cinq acides aminés dans le cytosol (Isoleucine, Phénylalanine, Tyrosine, Glutamate, Tryptophane) et de deux acides aminés dans la mitochondrie (Leucine, Valine). Les voies cataboliques concernées sont la réaction de production d'acétaldéhyde à partir du pyruvate dans le cytosol et les voies de dégradation de six acides aminés (Isoleucine, Phénylalanine, Tyrosine, Tryptophane, Valine, Leucine).

Le CO₂d intervient comme substrat dans une réaction du métabolisme de *S. cerevisiae* : synthèse de 5-amino-4-carboxy amino -imidazole ribonucléotide à partir de 5 amino-imidazole ribonucléotide (AIR). Cette réaction est impliquée dans la synthèse de nucléotides puriques.

Les ions hydrogénocarbonates et carbonates interviennent également dans le métabolisme de *S. cerevisiae*. Les bases de données métaboliques ne permettent pas de distinguer ces deux ions, mais en raison du pH cytosolique (environ 7) et mitochondriaux (environ 7.5) seul l'ion hydrogénocarbonate est considéré.

Les ions hydrogénocarbonates interviennent comme substrat dans trois réactions de l'anabolisme de *S. cerevisiae* :

- réaction de synthèse de malonyl - CoA à partir d'acétyl - CoA catalysée par l'enzyme acétyl-CoA synthase. Cette réaction est l'étape initiale de la synthèse des acides gras.

- réaction de synthèse d'oxaloacétate à partir de pyruvate catalysée par l'enzyme Pyruvate Carboxylase. Cette réaction fait partie des voies anaplérotiques.

- réaction de synthèse de carbamoyl phosphate à partir d'un groupement amine primaire (par exemple portée par la glutamine). Cette réaction se déroule dans la mitochondrie et le carbamoyl phosphate est impliqué dans la synthèse de l'arginine et aussi, pour une plus faible part, dans la synthèse de nucléotides pyrimidiques.

1.3.1.2 Cas de l'enzyme Anhydrase carbonique

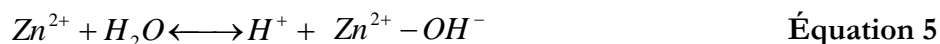
L'anhydrase carbonique (CA, EC 4.2.1.1) est une enzyme catalysant l'inter-conversion du dioxyde de carbone et de l'acide carbonique.



Les enzymes CA ont un turnover k_{cat} élevé, de l'ordre de 10^4 s^{-1} . L'isoenzyme la plus active est la forme CA II humaine avec un k_{cat} de 10^6 s^{-1} ce qui en fait l'enzyme la plus rapide trouvée jusqu'à présent (Potter and Harris, 2003).

L'enzyme anhydrase carbonique a été découverte pour la première fois dans les érythrocytes humains en 1933 (Smith et al., 1999). Les enzymes anhydrase carbonique sont groupées en cinq classes selon un critère d'homologie de séquence d'acides aminés. Malgré les différences de structure toutes les enzymes CA présentent des mécanismes d'action comparables, ce qui constitue un cas remarquable d'évolution convergente. Il semblerait donc que « la roue ait été inventée plusieurs fois » (Liljas and Laurberg, 2000). L'ion zinc semble être utilisé dans le site actif de la majorité des enzymes anhydrase carbonique (Tripp et al., 2001).

Dans le cas de la conversion du dioxyde de carbone en acide carbonique la première étape consiste en l'attaque nucléophile d'un complexe zinc-ion hydrophile sur une molécule de CO_2 contenue dans une poche hydrophile pour libérer un ion hydrogénocarbonate (Équation 4). La seconde étape est la régénération du site actif par l'hydratation de l'ion Zn^{2+} (Équation 5). Il est intéressant de constater que la réaction catalysée par l'enzyme anhydrase carbonique aboutit à la libération d'un ion hydrogénocarbonate et non d'une molécule d'acide carbonique comme c'est le cas pour la réaction non catalysée (Moroney et al., 2001; Smith and Ferry, 2000).



La structure et le rôle physiologique des enzymes anhydrase carbonique ont été étudiés de façon extensive chez les mammifères (Lindskog, 1997), les plantes (Moroney et al., 2001), les algues (Moroney et al., 2001) et les procaryotes (Smith et al., 1999; Smith and Ferry, 2000). Toutefois, peu d'études portent sur les enzymes fongiques (Elleuche and Pöggeler, 2010; Innocenti et al.,

2008). Les principaux modèles d'étude utilisés sont les levures *S. cerevisiae* (Aguilera et al., 2005a; Amoroso et al., 2005; Cronk et al., 2001; Götz et al., 1999) et *Candida albicans* (Bahn and Mühlischlegel, 2006).

L'étude de l'enzyme anhydrase carbonique chez *S. cerevisiae* est un sujet de recherche récent dans la mesure où le gène NCE103 codant pour une enzyme carbonique anhydrase putative a été découvert en 1996 chez *S. cerevisiae* (Cleves, 1996). Des études de séquençage du génome de *S. cerevisiae* ont permis d'identifier le gène NCE103 qui code pour un peptide de 221 acides aminés présentant une faible homologie de séquence (49%) avec la séquence d'enzymes anhydrase carbonique de la classe β (Götz et al., 1999). De plus le peptide Nce103 possède les résidus pour la fixation du zinc caractéristique du site actif des anhydrase carbonique de classe β : deux cystéines et une histidine (Clark et al., 2004). Le peptide Nce103 pourrait donc exprimer une activité anhydrase carbonique chez *S. cerevisiae*. Cependant, peu d'étude ont exploré le rôle physiologique de cette activité anhydrase carbonique pour la levure et les rares études existantes sont souvent contradictoires (Aguilera et al., 2005a; Amoroso et al., 2005; Clark et al., 2004; Götz et al., 1999).

1.3.2 Effet inhibiteur du dioxyde de carbone

Une littérature abondante a été consacrée à l'étude de l'effet du CO₂ sur les micro-organismes. Cette problématique remonte aux origines mêmes de la microbiologie moderne car les premiers rapports évoquant un impact négatif du CO₂ sur la production de bière par la levure *S. cerevisiae* datent de 1865 (Nipkow et al., 1985; Orloff, 1900), soit 8 ans seulement après les travaux de Pasteur sur la fermentation éthanolique (Pasteur, 1857). Bien que les effets du CO₂ sur la physiologie des micro-organismes hétérotrophes aient été bien documentés et aient même fait l'objet d'applications industrielles, le mécanisme d'action du CO₂ est toujours mal connu.

Les cultures présentées dans cette section ont été menées en utilisant des conditions expérimentales (température, pressions absolue, méthode d'enrichissement et de mesure du CO₂ dissous) très variées. Afin de faciliter la comparaison entre ces études il est choisi d'exprimer la teneur en CO₂ dans la phase liquide en concentration molaire car cette approche, bien que dépendante de la composition du milieu, est indépendante de la température et de la pression.

L'impact du dioxyde de carbone sur la physiologie de *S. cerevisiae* a fait l'objet de nombreux travaux. Ces travaux peuvent être classés en deux catégories selon l'utilisation de la levure :

- i) Utilisation de *S. cerevisiae* en anaérobiose pour la production de vin, de bière, d'éthanol : métabolisme fermentaire

- ii) Utilisation de *S. cerevisiae* en aérobiose ou micro-aérobiose en métabolisme oxydo-fermentaire : production d'éthanol carburant.
- iii) Utilisation de *S. cerevisiae* en aérobiose en métabolisme oxydatif : production de biomasse et de protéine hétérologue notamment.

1.3.2.1 Métabolisme fermentaire

En vinification et brassage les cultures sont souvent conduites en anaérobiose. Les concentrations en CO₂ dissous atteintes dans les réacteurs peuvent être importantes dans la mesure où les températures utilisées en brasserie sont souvent basses et l'absence de débit de ventilation courante. La plupart des études décrites en conditions d'anaérobiose utilisent des milieux complexes et le pH n'y est pas régulé (Karl et al., 1997; Knatchbull and Slaughter, 1987; Renger, 1991; Renger et al., 1992). Seule l'étude d'Aguilera est menée dans des conditions parfaitement maîtrisées en culture continue mais dans une gamme de concentration en CO₂ dissous modeste (Aguilera et al., 2005b). Des travaux ont été réalisés afin d'explorer la possibilité de réaliser des fermentations éthanoliques sous forte pression afin de permettre une extraction de l'éthanol en utilisant les propriétés de solvant du CO₂ supercritique (Thibault et al., 1987; Vezzù et al., 2009). Les gammes de concentrations explorées dans ces travaux sont donc plus élevées que celles rencontrées en conditions de culture.

L'analyse comparative des résultats de la littérature montre que le dioxyde de carbone impacte négativement la croissance de *S. cerevisiae* (Figure 5 A). Le taux de croissance observé en culture discontinue alimentée est ainsi diminué de 20% pour une concentration en CO₂ dissous de 28 mM par rapport à celui obtenu à 9.4 mM (Karl et al., 1997) et de 50% pour une concentration en CO₂ dissous de 109 mM par rapport à celui obtenu à 54 mM. L'impact sur le rendement en biomasse par rapport au substrat consommé semble modeste dans une gamme de concentration 0-37 mM dans la mesure où ce rendement reste globalement constant entre 0.46 et 37.39 mM (Aguilera et al., 2005b), entre 1.3 et 5.7 mM (Kuriyama et al., 1993) et entre 9.4 et 28.2 mM (Karl et al., 1997). Au-delà de cette gamme le rendement en biomasse peut être inhibé : une diminution de 20 % est observée pour 47 mM par rapport à 9.4 mM (Karl et al., 1997) et une diminution de 50% pour une concentration de 109 mM par rapport à 54 mM (Renger, 1991).

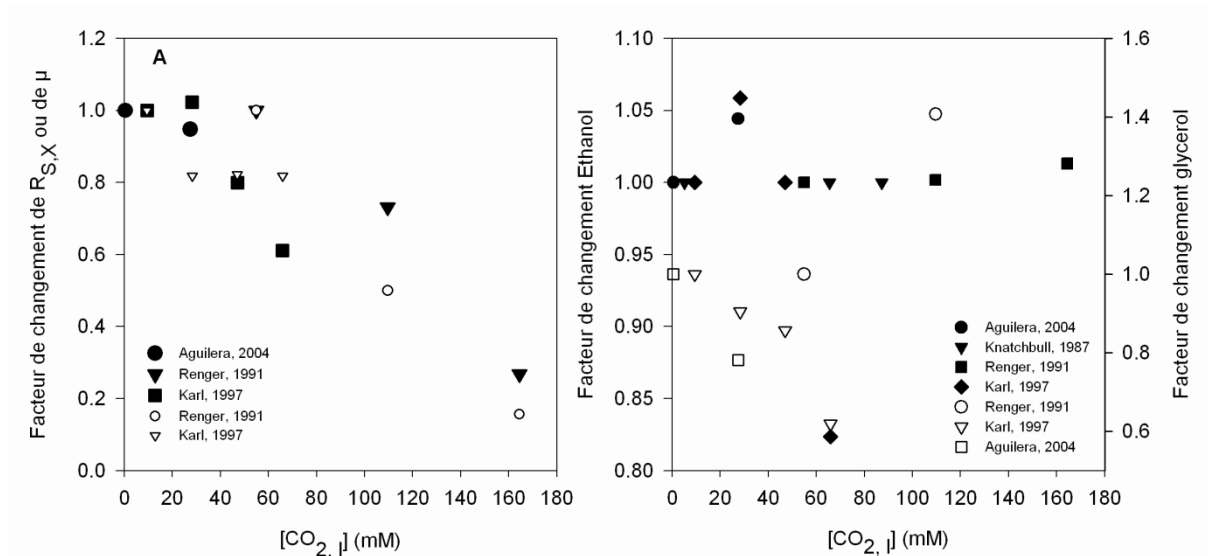


Figure 5. A : Impact du dioxyde de carbone sur le rendement en biomasse (symboles pleins) et le taux de croissance (symboles vides) de *S. cerevisiae* en anaérobiose. Renger, 1991 : culture discontinue. Aguilera, 2004 : Culture continue. Karl, 1997 : culture discontinue alimentée. **B :** Impact du dioxyde de carbone sur la production d'éthanol (symboles pleins) et de glycérol (symboles vides) par *S. cerevisiae* en anaérobiose. Renger, 1991 : culture discontinue, rendements en éthanol et glycérol. Aguilera, 2004 : culture continue, vitesse spécifique de production d'éthanol et glycérol. Knatchbull, 1987 : culture discontinue, anaérobiose, concentration maximale en éthanol. Karl, 1997 : culture discontinue alimentée, rendements en éthanol et glycérol.

La viabilité cellulaire semble peu affectée par le dioxyde de carbone en conditions d'anaérobiose dans la mesure où une diminution de 14% de ce paramètre est observée pour une concentration en CO₂ dissous de 87 mM (Knatchbull and Slaughter, 1987). De même une augmentation de 31% de la viabilité est observée pour une concentration en CO₂ dissous de 65.8 mM par rapport à une concentration de 9.4 mM. La diminution atteint un facteur de réduction de 3 log pour une concentration de 1.27 M (48 bars) et une exposition de 24h à 36°C (Vezzù et al., 2009). Bien que les paramètres opératoires de cette dernière étude correspondent aux gammes rencontrées dans les barèmes d'inactivation en H.P.C.D (High Pressure Carbon Dioxide) le facteur de réduction obtenu semble relativement modeste.

Le rendement de production d'éthanol semble peu affectée dans une gamme de concentration importante 0-180 mM (Figure 5 B) à l'exception des résultats rapportées par (Karl et al., 1997). Plusieurs études mentionnent l'allongement des durées de fermentation en cas d'enrichissement en CO₂ (Karl et al., 1997; Renger, 1991), attribuée à la baisse de la vitesse spécifique de production d'éthanol lorsque la concentration en CO₂ dissous augmente (Karl et al., 1997). L'impact du CO₂ sur la production d'éthanol semble plus important pour des concentrations en CO₂ dissous plus élevées (données non représentées) : la concentration maximale en éthanol

diminue de 75% pour une concentration en CO₂ dissous de 2.483 M (Thibault et al., 1987) et de 88 % pour concentration en CO₂ de 1.270 M (Vezzù et al., 2009). Il faut néanmoins remarquer que les quantités de substrat consommés dans les deux cas ne sont pas rapportées rendant impossible le calcul des rendements et que le pH n'est pas mesuré ni régulé en raison des fortes pressions utilisées.

L'impact sur la production de glycérol est plus important mais les résultats rapportés sont contradictoires (Figure 5 B). Une diminution de la production de glycérol est observée en culture continue lorsque la concentration en CO₂ dissous augmente de 0.46 mm à 27.39 mM (Aguilera et al., 2005b) et en culture discontinue alimentée lorsque la concentration en CO₂ dissous augmente de 9.4 mM à 28.2 mM (Karl et al., 1997) (Figure 5 B). Au contraire le rendement de production de glycérol obtenue en culture discontinue augmente lorsque la concentration en CO₂ dissous augmente de 54 mM à 109 mM (Renger, 1991). Ces résultats contradictoires pourraient être expliqués par un impact plus important du CO₂ en culture discontinue qu'en culture continue et discontinue alimentée. Dans tous les cas l'impact du CO₂ sur la production de glycérol en anaérobiose montre que le CO₂ pourrait avoir un impact sur la balance redox de *S. cerevisiae*.

Le CO₂ affecte également la production de composés volatils aromatiques comme les alcools (alcool iso-amylque notamment) et les esters (acétate d'éthyle et iso-amyl acétate). Cet effet peut donc impacter le profil aromatique du produit (vin ou bière) et donc sa qualité. Les concentrations des alcools et des esters diminuent lorsque la concentration en CO₂ dissous augmente (Knatchbull and Slaughter, 1987; Renger et al., 1992; Shen et al., 2004). Cette diminution atteint ainsi 20% pour l'alcool iso-amylque et 70% pour l'éthyl acétate pour une concentration en CO₂ dissous de 164 mM (Renger, 1991). Il a néanmoins été montré que ces diminutions étaient liés à l'inhibition de la croissance par le CO₂ dans la mesure et que les rendements en alcool et esters ne dépendent pas de la concentration en CO₂ dissous (Renger, 1991). Une autre étude suggère que le CO₂ altère la consommation de certains acides aminés branchés comme la valine et la leucine, substrats de base pour la synthèse de certains composés aromatiques (Knatchbull and Slaughter, 1987). Les mécanismes d'inhibition de ces voies anaboliques par le CO₂ n'ont cependant pas été investigués.

Une inhibition de la division cellulaire est reportée à partir d'une concentration en CO₂ dissous de 87 mM (Norton and Krauss, 1972) et de 110 mM (Renger, 1991). Cette inhibition pourrait provenir d'une inhibition de la formation de bourgeons (Norton and Krauss, 1972) bien qu'aucune anomalie de la formation de bourgeon n'ait été observée dans une autre étude pour des concentrations en CO₂ dissous allant jusqu'à 65.8 mM. La réplication du matériel génétique

n'est pas affectée (Norton and Krauss, 1972) et l'inhibition de la division cellulaire pourrait alors expliquer les variations de taille des cellules observées pour des concentrations en CO_2 dissous de 47 et 65.8 mM (Karl et al., 1997).

En métabolisme anaérobie des concentrations en CO_2 dissous modérées (< 30 mM) ne semblent pas avoir d'effet sur le rendement en biomasse mais pourraient affecter le taux de croissance (jusqu'à - 20 %). En revanche des concentrations en CO_2 dissous élevées (>60 mM) diminuent le rendement en biomasse et le taux de croissance. Le CO_2 pourrait donc être un facteur impliqué dans les retards ou arrêts de fermentation observés en brasserie et viniculture. La production d'éthanol et de glycérol semble peu affectée.

1.3.2.2 Métabolisme oxydo-fermentaire

Le dioxyde de carbone impacte la croissance de *S. cerevisiae* en métabolisme oxydo-fermentaire (Figure 6 A). Le taux de croissance est ainsi diminué de 85 % lorsque la concentration en CO_2 dissous augmente de 0.06 à 14.19 mM (Campelo and Belo, 2004) mais diminue de 26 % seulement pour une augmentation de la concentration en CO_2 dissous de 0.01 à 23.63 mM (Nagahisa et al., 2005).

Le rendement en biomasse est aussi affecté en cas d'enrichissement CO_2 et diminue de 20 % lors d'une culture discontinue alimentée lorsque la concentration en CO_2 dissous augmente de 0.05 à 14.37 mM (Belo et al., 2003). De même une réduction du rendement en biomasse de 32 % et 43 % est observée en conditions aérobie et micro-aérobie respectivement lorsque la concentration en CO_2 dissous augmente de 1.30 mM à 5.76 mM dans une culture continue (Kuriyama et al., 1993). Pour ces travaux le rendement est calculé uniquement par rapport à la consommation de glucose, cette source de carbone étant très majoritaire par rapport à l'extrait de levure et à la peptone (Kuriyama et al., 1993). Il est intéressant de noter que l'effet du CO_2 augmente avec la vitesse spécifique de consommation de l'oxygène ($q_{\text{O}_2} = 100 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en aérobie et $35 \mu\text{mol.g}^{-1}.\text{h}^{-1}$ en micro-aérobie). Une diminution de 10% du rendement en biomasse est également observée en culture continue conduite avec une limitation dans l'apport d'azote lorsque la concentration en CO_2 dissous augmente de 0.46 à 21.70 mM, sans que la vitesse spécifique de consommation d'oxygène soit significativement affectée (Aguilera et al., 2005b). La viabilité cellulaire est peu affectée par une concentration en CO_2 dissous de 1.42 mM (Belo et al., 2003) mais diminue de 25% pour une concentration en CO_2 dissous de 14.189 mM (Campelo and Belo, 2004).

Le CO₂ impacte aussi la formation de co-produits (Figure 19 B). Une augmentation du rendement de production d'éthanol de +7-8% est noté lorsque la concentration en CO₂ dissous augmente de 1.30 mM à 5.76 mM dans une culture continue tant en condition aérobie que micro-aérobie (Kuriyama et al., 1993). Parallèlement il est observé une diminution du rendement de production de glycérol dans les deux conditions de l'ordre de 50%. De même, une augmentation de la vitesse spécifique de production d'éthanol de + 22% est observée en culture continue aérobie limitée en azote lorsque la concentration en CO₂ dissous passe de 0.46 à 21.70 mM (Aguilera et al., 2005b). L'augmentation de la concentration en CO₂ dissous augmente donc la production d'éthanol en métabolisme oxydo-fermentaire et donc la production et/ou consommation d'énergie.

La capacité fermentaire est définie comme la vitesse maximale de production d'éthanol en conditions anaérobie à partir d'un échantillon de culture réalisée en mode oxydatif. Une diminution de 20% de la capacité fermentaire est rapportée pour une concentration en CO₂ dissous de 25.45 mM (non observé pour les concentrations inférieures) en culture fed-batch (Chen and Gutmanis, 1976) mais aucune variation significative n'est signalée en culture continue pour une concentration en CO₂ dissous maximale de 22.30 mM (Aguilera et al., 2005b).

Il est également intéressant de noter qu'une augmentation de la concentration en CO₂ dissous de 0.46 à 21.70 mM en culture continue limitée en azote provoque une augmentation de la vitesse spécifique de production du succinate (de 0.04 à 0.08 mmol.g_x.h⁻¹) bien qu'aucune explication ne soit provoquée par les auteurs (Aguilera et al., 2005b). L'enrichissement en CO₂ ne provoque cependant pas d'augmentation de la production de succinate en culture discontinue (Otero Romero, 2009).

Des modifications de la composition en acides gras de la membrane plasmique ont été rapportées lors d'un enrichissement CO₂ réalisé sur une culture de *S. cerevisiae* en mode oxydo-fermentaire (Castelli et al., 1969). Les auteurs montrent qu'un enrichissement en CO₂ de 5.87 à 17.62 mM et ions hydrogénocarbonates provoque une augmentation de la quantité totale de lipides dans la membrane, de la quantité totale d'acides gras dans la membrane et du degré général d'insaturation de ces acides gras. Les conclusions des auteurs doivent toutefois être considérées avec prudence dans la mesure où ils ne considèrent pas l'existence des équilibres dynamiques entre le CO₂ et les ions hydrogénocarbonates, ceux-ci rendant impossible l'augmentation de la concentration en CO₂ à pH constant sans augmenter de fait la concentration en carbonates. De plus les concentrations en ions hydrogénocarbonates semblent sous-estimées d'un facteur deux. Les travaux de Kuriyama ne montrent pas de changement de composition en acides gras de la membrane

plasmique pour chacune des conditions (aérobie et micro-aérobie) sur une gamme de concentration 1.30-5.76 mM. En revanche le degré d'insaturation des acides gras de la membrane est deux fois plus faible en conditions micro-aérobies qu'en conditions aérobie.

En métabolisme oxydo-fermentaire le rendement en biomasse pourrait être affecté pour des concentrations en CO_2 dissous de l'ordre 3-7 mM. Les diminutions maximales rapportées sont de l'ordre de 20% pour des concentrations en CO_2 dissous modérées (< 30 mM). Le taux de croissance semble plus affecté par ces concentrations (de -40 à 80%). La production d'éthanol semble augmenter et celle de glycérol diminuer.

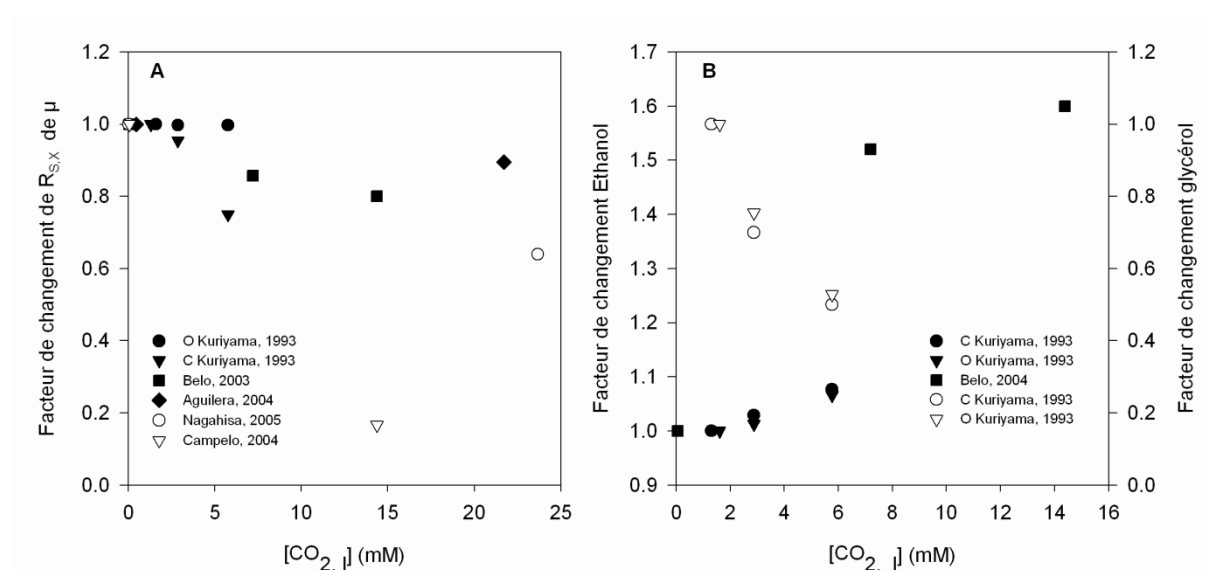


Figure 6. A : Impact du dioxyde de carbone sur le rendement en biomasse (symboles pleins) ou le taux de croissance (symboles vides) de *S. cerevisiae* en métabolisme oxydo-fermentaire. Kuriyama, 1993 : culture continue limitée en glucose (C) ou par l'apport d'oxygène (O, micro-aérobie), rendement en biomasse. Belo, 2003 : culture discontinue alimentée, concentration maximale en biomasse. Nagahisa, 2005 : culture discontinue, taux de croissance. Campelo, 2004 : fed-batch, taux de croissance. Aguilera, 2004 : culture continue limitée en N, rendement en biomasse. **B :** Impact du dioxyde de carbone sur la production d'éthanol (symboles pleins) ou de glycérol (symboles vides) de *S. cerevisiae* en métabolisme oxydo-fermentaire. Kuriyama, 1993 : culture continue limitée en glucose (C, aérobie) ou par l'apport d'oxygène (O, micro-aérobie), rendement en éthanol et en glycérol. Belo, 2003 : culture discontinue alimentée, concentration maximale en éthanol.

1.3.2.3 Métabolisme oxydatif

Dans la littérature seules trois études ont été consacrées à l'impact du dioxyde de carbone sur la levure en métabolisme oxydatif (Aguilera et al., 2005b; Chen and Gutmanis, 1976; Krook et al., 2004). L'impact du dioxyde de carbone sur la croissance de la levure en métabolisme oxydatif est important (Figure 7 B). Une diminution de 24% du rendement en biomasse est ainsi observée lors d'une culture continue limitée en carbone lorsque la concentration en CO_2 dissous augmente

de 0.22 à 22.30 mM (Aguilera et al., 2005b). Cette diminution est couplée à une augmentation de 74% de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène et de 28% de la vitesse spécifique de consommation de glucose. De même une diminution du rendement en biomasse est observée lors d'une culture discontinue alimentée lorsque la concentration en CO₂ dissous est supérieure à 13.5 mM et atteint 54% pour une concentration de 25.45 mM (Chen and Gutmanis, 1976). L'évolution des vitesses de respiration n'est cependant pas mentionnée dans cette étude. Enfin, la réponse de la levure à un incrément de concentration en CO₂ dissous de 0.3 mM a été étudiée en culture continue limitée en carbone (Krook et al., 2004; Mashego, 2005a). L'augmentation de la concentration en CO₂ dissous provoque une augmentation transitoire de 75% des vitesses de respiration liée à une mobilisation des sucres de réserve glycogène et tréhalose. Ces travaux montrent donc que de fortes concentrations en CO₂ dissous provoquent une augmentation de la production et /ou de la consommation d'énergie par *S.cerevisiae*.

Les travaux réalisés en culture continue sur l'impact du dioxyde de carbone sur *S. cerevisiae* en métabolisme oxydatif (Aguilera et al., 2005b; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a) sont remarquables car i) la levure est mise en œuvre dans des conditions maîtrisées et en utilisant un milieu synthétique ii) les vitesses de respiration brutes et spécifiques sont calculées et présentées iii) les bilans de matière sont vérifiés en régime permanent (Krook et al., 2004; Mashego, 2005a) ou abordés (Aguilera et al., 2005b). Il faut cependant remarquer que les bilans de matière lors du régime transitoire suivant l'échelon de CO₂ ne sont pas présentés (Krook et al., 2004; Mashego, 2005a) et que les vitesses spécifiques de respiration sont particulièrement bruitées (Aguilera et al., 2005b).

Il est également intéressant de noter qu'une augmentation de la concentration en CO₂ dissous de 0.22 à 22.30 mM en culture continue provoque une augmentation de la vitesse spécifique de production du succinate (de 0.00 à 0.13 mmol.g_x.h⁻¹) bien qu'aucune explication ne soit proposée par les auteurs (Aguilera et al., 2005b). Un phénomène similaire était observé en culture continue aérobie limitée en azote dans la même étude (chapitre 1.3.2.2).

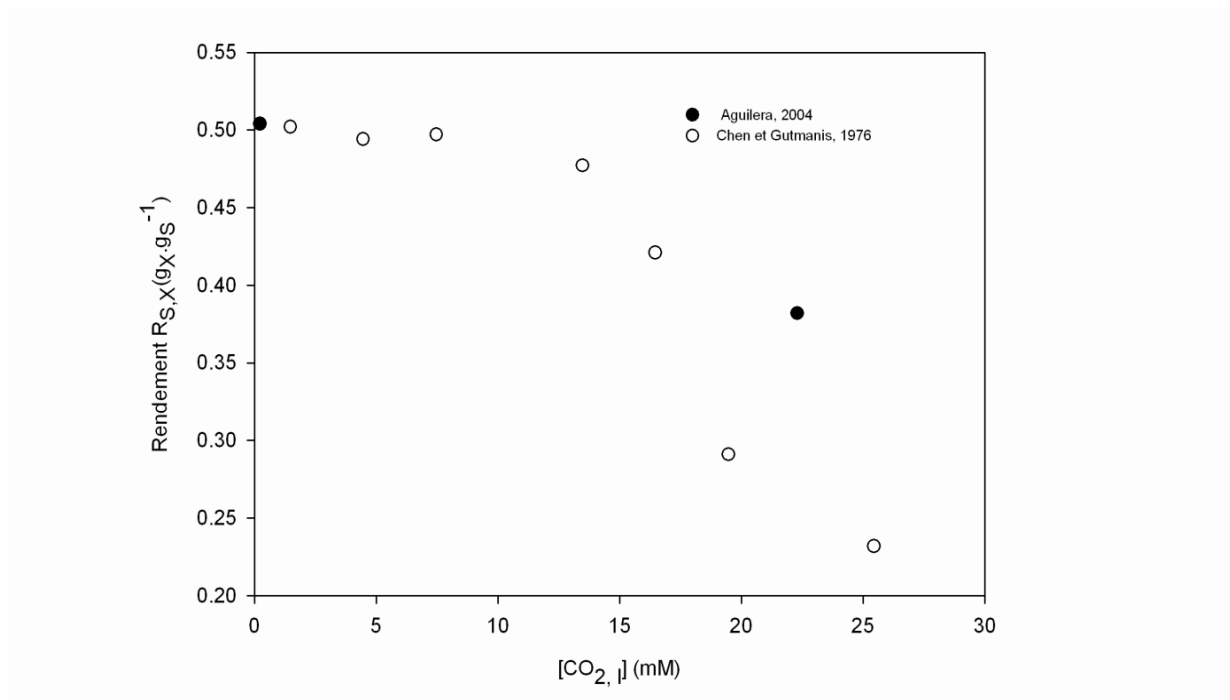


Figure 7. Impact du dioxyde de carbone sur le rendement en biomasse de *S. cerevisiae* en métabolisme oxydatif. Chen et Gutmanis, 1976 : culture discontinue alimentée. Aguilera, 2004: culture continue limitée en carbone.

1.3.2.4 Analyse transcriptomique de l'effet inhibiteur du dioxyde de carbone

A ce jour deux études transcriptomique ont été réalisées pour comprendre l'impact du dioxyde de carbone sur la levure *S. cerevisiae* (Aguilera et al., 2005b; Nagahisa et al., 2005). Toutes deux s'intéressent aux changements dans le transcriptome induits par le CO₂. Une des études a été réalisée par application d'un stress CO₂ équivalent à une concentration en CO₂ dissous de 23.7 mM durant la phase exponentielle de cultures discontinues (Nagahisa et al., 2005). La levure est donc mise en œuvre en métabolisme oxydo-fermentaire. La seconde étude est réalisée par application d'un stress CO₂ équivalent à une concentration en CO₂ en phase liquide de 23.7 mM durant une culture continue à pH 5.0 (Aguilera et al., 2005b). La condition sans stress est représentée par un régime permanent témoin sans enrichissement CO₂, la condition avec stress est représentée par un régime permanent avec enrichissement CO₂. La levure est mise en œuvre en métabolisme fermentaire, oxydo-fermentaire (aérobie limitation azote) ou oxydatif (aérobie limitation carbone) et l'étude transcriptomique est comparée pour chaque cas à une étude cinétique macroscopique.

Le stratégie de culture discontinue utilisée dans la première étude peut présenter des aspects discutables car i) en culture discontinue les évolutions dynamique de plusieurs variables d'état sont susceptibles d'interférer entre elles contrairement à une culture continue qui permet d'isoler une

seule variable effectrice ii) il a été démontré que les résultats de génomique fonctionnelle obtenus en culture discontinue étaient sujets à des variations importantes dont la culture continue permet de s'affranchir (Daran-Lapujade et al., 2009).

De plus, le protocole de quenching dans l'azote liquide utilisé dans l'étude en culture discontinue est pratiqué sur les prélèvements de moût centrifugés durant 10 min, au contraire de la seconde étude pour laquelle il est réalisé instantanément lors de l'échantillonnage. Les profils d'expression des gènes paraissent donc plus représentatifs suivant la seconde procédure alors que dans la première une évolution significative de l'expression est susceptible de se produire durant l'étape de centrifugation.

L'application du stress CO₂ à une culture discontinue de *S. cerevisiae* en métabolisme oxydo-fermentaire provoque peu de changements dans les profils d'expression génétique au total sur 6059 gènes étudiés, seuls 75 gènes ont une expression qui varie significativement lors de l'enrichissement CO₂ (Nagahisa et al., 2005). Le regroupement des gènes en catégories fonctionnelles ne montre pas d'évolution significative de ces classes lors de l'enrichissement, à l'exception des gènes impliqués dans la synthèse du ribosome. L'expression de 21 gènes augmente dont 4 gènes impliqués dans le métabolisme des sucres (GPH1, GSY1, PGM2, GLK1), 6 gènes impliqués dans la réponse cellulaire au stress (dont GAD1 et GPX2 : réponse au stress oxydatif, HSP26 : réponse générale au stress, HOR7 et GLK1 : réponse au stress osmotique) et un gène impliqué dans le cycle de Krebs (CIT2). L'expression de 53 gènes diminue dont 22 gènes impliqués dans la synthèse du ribosome, 5 gènes impliqués dans le métabolisme des lipides (OLE1, IZH4, FAA4, IZH1 et en particulier FAS32 codant pour une enzyme désaturase catalysant la formation d'acides gras non saturés) et le gène ALD6 codant pour l'acétaldéhyde déshydrogénase.

L'application du stress CO₂ à une culture continue de *S. cerevisiae* en culture continue provoque peu de changements dans les profils d'expression génétique quel que soit le métabolisme mis en œuvre (fermentaire, oxydo-fermentaire ou oxydatif) (Aguilera et al., 2005b). Un changement d'expression est ainsi observé pour 1.10 % des gènes en métabolisme oxydatif contre 0.35 % en métabolisme fermentaire et 0.36 % en métabolisme oxydo-fermentaire. Ces résultats confirment que le métabolisme oxydatif pur est le plus sensible au CO₂ comme remarqué lors de l'analyse macroscopique (chapitre 1.3.2). En métabolisme oxydatif il est observé une augmentation significative de l'expression de 4 gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus mitochondrial de phosphorylation oxydative (COX11P, COX17P, COX18P codant pour la cytochrome c oxydase; ATP11 codant pour ATP synthétase) et de gènes codant pour des

protéines impliquées dans des voies métaboliques faisant intervenir le CO₂ (PCK1 codant pour la Phosphoenolpyruvate carboxykinase; PYC1 codant pour la Pyruvate carboxylase; AR010 codant pour une protéine impliquée dans la voie de synthèse de la phénylalanine). En revanche une diminution de l'expression du gène NCE103, pouvant coder pour une enzyme Anhydrase carbonique, est observée. Seuls 8 gènes ont une expression qui change significativement en cas d'enrichissement dans les deux conditions aérobies (IMD1, YAR075W, COS12, MHT1, DIP5, KNH1, OYE3, NCE103 et YJL037W). Parmi ces 8 gènes seul NCE103 code pour une enzyme dont l'activité peut être reliée au CO₂.

La comparaison des résultats de transcriptomique obtenus pour un stress équivalent concentration en CO₂ dissous de 23.7 mM) dans une culture continue (Aguilera et al., 2005b) et une culture batch (Nagahisa et al., 2005) de *S. cerevisiae* en métabolisme oxydo-fermentaire ne révèle aucun point commun dans les profils d'expression génétique obtenus. L'empreinte du CO₂ sur le transcriptome de la levure semble donc dépendre fortement des conditions de mise en œuvre de la culture. Les résultats de génomique fonctionnelle les plus saillants ont été mis en évidence par Aguilera pour un enrichissement en CO₂ en culture continue limité en carbone de *S. cerevisiae* (Aguilera et al., 2005b). Il faut toutefois remarquer que l'augmentation de l'activité de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs pouvait être déduite de l'augmentation des vitesses spécifiques de respiration. L'analyse transcriptomique, lourde en termes d'investissement expérimental, ne semble donc pas apporter d'informations pertinentes par rapport à une analyse cinétique macroscopique.

Le croisement des résultats de transcriptomique obtenus pour un stress CO₂ (concentration en CO₂ dissous de 23.7 mM) appliqué sur des cultures continues (Aguilera et al., 2005b) et discontinues (Nagahisa et al., 2005) de la levure *S. cerevisiae* avec les profils d'expression génique obtenus par qRT-PCR lors de l'application d'un stress CO₂ (concentration en CO₂ dissous maximal de 7.53 mM) dans des cultures batch d'*E. coli* (Baez, 2009) pourrait faire émerger une empreinte génétique de l'action du CO₂ sur les micro-organismes. Une similarité frappante est remarquée dans l'augmentation de l'expression des gènes *pcka* et PCK1 codant pour l'enzyme phosphoenol pyruvate kinase chez *E. coli* et *S. cerevisiae* (culture continue aérobie limitée en carbone). De plus, on observe une contradiction entre la diminution de l'expression des gènes *idca*, *succA* et *succB* codant pour des enzymes du cycle de Krebs en cas d'enrichissement CO₂ chez *E. coli* et l'augmentation de l'expression de gènes codant pour des protéines impliquées dans le processus de phosphorylation oxydative obtenue en cas d'enrichissement CO₂ chez *S. cerevisiae* (Aguilera et al., 2005b). Il faut toutefois noter que pour la levure cette augmentation est

confirmée par l'augmentation des vitesses spécifiques de respiration, qui n'est pas rapportée pour les cultures d'*E. coli*. Enfin, il est possible de voir une similitude entre l'augmentation de l'expression des gènes impliqués dans les voies de résistance aux stress (oxydatif ou osmotique) obtenue en culture discontinue de *S. cerevisiae* (Nagahisa et al., 2005) et l'augmentation des gènes codant pour des protéines impliquées dans la résistance à un stress acide obtenue en culture batch d'*E. coli* (Baez, 2009).

Ces études de génomique fonctionnelle confirment que le CO₂ est donc un facteur de stress quel que soit le micro-organisme traité, mais ne permettent pas de mettre en évidence un vecteur d'action de ce stress.

1.3.3 Mécanismes d'action du dioxyde de carbone

L'effet inhibiteur du dioxyde de carbone sur la physiologie de nombreux micro-organismes a été observé. Cet effet est même utilisé à l'échelle industrielle comme agent d'inactivation de microorganismes dans les denrées alimentaires via la technique H.P.C.D (High Pressure Carbon Dioxide) (Garcia-Gonzalez et al., 2007; Zhang et al., 2006). Pour autant la mécanistique de cet effet inhibiteur est encore mal connue et les effets observés du CO₂ pourraient résulter de l'action séparée ou simultanée de plusieurs mécanismes.

1.3.3.1 Action sur le pH intracellulaire

Les équilibres dynamiques du système C.I.T (Carbone Inorganique Total) en phase liquide et en phase biomasse impliquent des protons (chapitre 1.3.4). Une augmentation de la concentration en CO₂ dans un milieu de culture peut donc avoir un impact sur la valeur du pH intracellulaire.

Plusieurs auteurs mentionnent comme probable un impact du CO₂ sur le pH intracellulaire dans le cas de cultures cellulaires (Aboka et al., 2012; Aguilera et al., 2005b; Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Dixon and Kell, 1989; Den Hollander et al., 1981; Kresnowati et al., 2008a; Mashego, 2005b; McIntyre and McNeil, 1997a; McIntyre and McNeil, 1997b; McIntyre and McNeil, 1997c; McIntyre and McNeil, 1998; Orij et al., 2011; Orij et al., 2012; Shen et al., 2004). De même cet effet est aussi mentionné dans le cas de l'utilisation du CO₂ comme agent d'inactivation en H.P.C.D (Garcia-Gonzalez et al., 2007; Zhang et al., 2006). Cette hypothèse est cependant rarement discutée de façon quantitative et/ou prouvée de façon expérimentale.

Il a été démontré par utilisation de sondes fluorescentes que l'exposition de cellules de *Bacillus subtilis* à de fortes pressions en CO₂ similaires à celles rencontrées lors de traitement H.P.C.D conduit à une réduction du pH intracellulaire de 3.20 (55 bars, 30°C, 5 min soit 1.647 M) à 3.09

(300 bars, 25°C, 5min) (Spilimbergo et al., 2005). Des résultats similaires ont été observés pour *Listeria monocytogenes* pour un traitement à 6.8 MPa de CO₂ sous 25°C (soit 0.9 M) (Spilimbergo et al., 2010). L'utilisation d'une sonde pHfluorine (Orij et al., 2009) a récemment permis de démontrer qu'un traitement H.P.C.D modeste (0.5 MPa et 25°C soit 131 mM) pouvait diminuer le pH intracellulaire de *S. cerevisiae* de 7.0 à 5.8 (Giulitti et al., 2011). Il faut toutefois remarquer que ces résultats ont été obtenus i) pour des concentrations en CO₂ très supérieures à celles rencontrées en conditions de culture microbienne ii) en utilisant des suspensions cellulaires donc dans des conditions imparfaitement contrôlées (notamment alimentation substrat, pH, concentration en CO₂ en phase liquide) et sans quantification d'autres réponses physiologiques des microorganismes (excepté le pH intracellulaire). Seule une étude rapporte la mesure du pH intracellulaire de cellules de mammifères CHO par utilisation de sondes fluorescentes dans des conditions réelles de cultures (Jockwer et al., 2007). Une augmentation de la concentration en CO₂ dissous de 0.8 mM à 6.2 mM en culture continue provoquerait une augmentation du pH intracellulaire de 7.0 à 7.2. Il faut toutefois remarquer que la précision de la méthode de détermination du pH intracellulaire n'est pas fournie par les auteurs et que le protocole expérimental est peu clair. Enfin la contribution de la production de dioxyde de carbone sur la diminution transitoire du pH intracellulaire observée suite à un ajout pulsé de glucose en culture continue de *S. cerevisiae* a été évaluée de façon quantitative et jugée faible par rapport à la contribution de la production d'acétate (Kresnowati et al., 2008a). Cette revue de la littérature montre donc un manque de données quantitatives sur l'impact du dioxyde de carbone sur le pH intracellulaire des microorganismes dans la gamme de concentrations rencontrées en cultures microbiennes (0-30 mM).

Pour faire face à cette apport de protons la levure dispose de plusieurs mécanismes de régulation du pH intracellulaire à savoir le pouvoir tampon, les pompes à protons Pma1p et V-ATPase, l'utilisation de flux de cations. Le rôle des pompes Pma1p dans le maintien de l'homéostasie du pH intracellulaire lors d'un stress CO₂ est démontré par le fait qu'une souche dont l'activité des pompes H⁺/ATPase membranaires est inhibée par le vanadate montre une sensibilité accrue à un traitement de type H.P.C.D (Watanabe et al., 2005). De même des études d'H.P.C.D réalisées sur des souches présentant une activité réduite des pompes vacuolaires à protons ont confirmé le rôle de ces pompes dans la séquestration de protons dans les vacuoles lors d'un stress CO₂ (Abe and Horikoshi, 1998; Watanabe et al., 2005). Aucune donnée n'est cependant disponible sur le rôle des pompes Pma1p et V-ATPases lors d'un stress CO₂ en conditions de culture.

L'expulsion de protons par les pompes membranaires ou leur séquestration dans la vacuole crée un déséquilibre du potentiel de charge membranaire $\Delta\Psi$ dans la mesure où les ions hydrogénocarbonates ne peuvent traverser la membrane plasmique et s'accumulent dans la cellule. Ce déséquilibre peut être compensé par une entrée de cations. L'accumulation de potassium suite à un stress CO_2 a ainsi déjà été démontré expérimentalement (Peña, 1975; Ryan et al., 1971; Ryan et al., 1972). Cet influx de potassium conduirait cependant à une augmentation de la pression osmotique intracellulaire. L'absence de transporteurs des ions hydrogénocarbonates empêche l'extrusion active de ces anions comme c'est le cas pour les transporteurs Pdr12p ou Tpo2p / Tpo3p dans le cas d'un stress acide.

1.3.3.2 Action sur la membrane plasmique

Plusieurs auteurs mentionnent un effet du CO_2 ou des ions hydrogénocarbonates sur la membrane plasmique (Castelli et al., 1969; Garcia-Gonzalez et al., 2007; Isenschmid, 1995; Jones and Greenfield, 1982; Sears, 1961).

Le CO_2 est une molécule apolaire et peut diffuser à travers la membrane plasmique et se dissoudre dans la double couche phospholipidique. Le coefficient de partition eau / octanol (Equation 24) est généralement considéré comme indicatif de la solubilité d'une molécule dans les membranes plasmiques (Abbott et al., 2007). Ce coefficient est de 1.3 pour le CO_2 qui signifie que la concentration du CO_2 dans l'octanol est 20 fois plus importante que sa concentration dans l'eau. De même le coefficient de partition du CO_2 dans un liposome est de 0.95 à 25°C et l'ajout de cholestérol diminue cette valeur à 0.71 (Simon and Gutknecht, 1980). La forte solubilité du CO_2 dans une membrane modèle constituée de phosphatidyléthanol et de phosphatidylglycérol a été confirmée par (Spilimbergo et al., 2002). La présence du CO_2 dans la membrane plasmique provoque des changements dans la fluidité de la membrane ce qui a des conséquences sur l'ensemble des fonctions cellulaires assurées par la membrane : compartimentation vis-à-vis du milieu extérieur, augmentation de la perméabilité de la membrane et donc sur les mécanismes de diffusion passive, impact sur les perméases et donc sur les mécanismes de diffusion facilitée, impact sur la division cellulaire (Isenschmid, 1995; Jones and Greenfield, 1982). Cet effet est connu sous le nom d'effet anesthésiant et est peu documenté pour le CO_2 (Garcia-Gonzalez et al., 2007; Jones and Greenfield, 1982). L'action du CO_2 a également été associée à une modification de la composition de la membrane plasmique de *S. cerevisiae*, notamment à une augmentation de la teneur en lipides et à une augmentation du ratio d'acides gras insaturés par rapport aux acides gras saturés (Castelli et al., 1969). Il faut néanmoins rester prudent avec cette

étude étant donné les ambiguïtés du protocole expérimental sur l'estimation des concentrations du CO₂ et d'hydrogénocarbonates.

Il semble néanmoins que le CO₂ augmente la perméabilité de la membrane plasmique de cellules de plantes pour l'eau, ce qui est contraire à l'action des molécules anesthésiantes qui diminuent cette perméabilité (Jones and Greenfield, 1982). Aucune donnée n'est cependant disponible à ce sujet pour *S. cerevisiae*.

Enfin les ions hydrogénocarbonates pourraient avoir une action séparée sur la face externe de la membrane plasmique en diminuant la tension superficielle, en augmentant l'hydratation et en modifiant l'arrangement lipidique (Sears, 1961). Il a également été suggéré que les ions hydrogénocarbonates puissent interagir avec les charges positives de la face externe de la membrane plasmique et modifient le potentiel de charge membranaire $\Delta\Psi$ (Jones and Greenfield, 1982).

L'action du CO₂ sur la membrane plasmique ne semble toutefois pas déterminante dans l'effet inhibiteur du CO₂ dans la mesure où il devrait être observé de façon équivalente tant en anaérobiose qu'en aérobiose comme c'est le cas pour les acides faibles (Abbott et al., 2007; Verduyn, 1992). Or la comparaison de l'action du CO₂ en anaérobiose et en aérobiose montre que l'effet du CO₂ est plus marqué à concentration équivalente en anaérobiose (Aguilera et al., 2005b; Kuriyama et al., 1993). De plus une étude de transcriptomique réalisée lors d'un enrichissement en CO₂ ne montre pas de changement de l'expression de gènes impliqués dans le remodelage de la membrane plasmique (SPI1 et OLE1 notamment) (Aguilera et al., 2005b). L'action du CO₂ sur la membrane semble donc faible.

1.3.3.3 Action sur la synthèse ou l'activité d'enzymes

Des concentrations élevées en CO₂ ou ions hydrogénocarbonates peuvent affecter l'activité d'enzymes catalysant des réactions impliquées dans le catabolisme énergétique de *S. cerevisiae* (Jones and Greenfield, 1982). Il a ainsi été rapporté qu'une concentration en ions hydrogénocarbonates de 100 mM réduisait l'activité de l'enzyme isocitrate déshydrogénase impliqué dans le cycle de Krebs de 60%. De même, l'activité de l'enzyme Pyruvate kinase, impliquée dans la catalyse d'une voie anaplérotique, est diminuée de 70% pour une concentration en ions hydrogénocarbonates de 70 mM.

Un effet inhibiteur des ions hydrogénocarbonates sur l'action du complexe enzymatique F1F0ATPase impliqué dans la synthèse d'ATP au niveau de la chaîne respiratoire a été décrit pour des mitochondries de cœur de bœuf (Lodeyro et al., 2001).

1.3.3.4 Effet d'action de masse

Le CO_2 et les ions hydrogénocarbonates sont impliqués en tant que produit ou substrat dans de nombreuses réactions du métabolisme cellulaire. Par conséquent les concentrations de ces composés ont un impact direct sur l'équilibre de ces réactions par loi d'action de masse. Il est cependant difficile d'estimer le statut thermodynamique d'une réaction *in vivo* (sens de la réaction, état d'équilibre ou non et réversibilité (Canelas et al., 2011)) et donc d'estimer l'impact qu'une modification de la concentration en CO_2 et les ions hydrogénocarbonates peut avoir sur ce statut.

L'hypothèse la plus courante est de considérer que les réactions sont à l'équilibre et de calculer la variation d'énergie libre de Gibbs d'une réaction induite par un changement de la concentration en CO_2 ou en ions hydrogénocarbonates (Jones and Greenfield, 1982). Ainsi, la variation d'énergie libre de Gibbs de la réaction anaplérotique catalysée par la pyruvate kinase en cas d'enrichissement CO_2 a été quantifié à partir d'une estimation de la constante d'équilibre de cette réaction (Goldberg et al., 2004; Otero Romero, 2009).

Le calcul des ratios d'action de masse des réactions impliquées dans la glycolyse et le cycle de Krebs à partir des mesures des concentrations de métabolites intracellulaires a été proposé par (Mashego, 2005a). Les données sont toutefois bruitées et il apparaît difficile d'interpréter l'évolution de ces ratios suite à un incrément de la concentration en CO_2 dissous.

1.3 Transfert interphasiques du dioxyde de carbone en bioréacteur

1.3.2 Solubilité du dioxyde de carbone et de l'oxygène

▪ Loi de Henry

Le dioxyde de carbone et l'oxygène sont des composés peu solubles en phase liquide. La loi d'équilibre thermodynamique à l'interface à liquide/ gaz est donc la loi de Henry (Equation 6 pour le dioxyde de carbone, Equation 7 pour l'oxygène). L'impact de la température et de la composition du milieu sur les coefficients de Henry sont présentés dans l'Annexe 1.

$$x_{\text{CO}_2} = H_{\text{CO}_2} \cdot p\text{CO}_{2,G} \quad \text{Equation 6}$$

Avec x_{CO_2} Concentration en dioxyde de carbone dissous (mole.m^{-3})
 H_{CO_2} Coefficient de Henry du dioxyde de carbone ($\text{mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$)
 $p\text{CO}_{2,G}$ Pression partielle en dioxyde de carbone dans la phase gaz (Pa)

$$x_{\text{O}_2} = H_{\text{O}_2} \cdot p\text{O}_{2,G} \quad \text{Equation 7}$$

Avec	x_{O_2}	Concentration en oxygène dans la phase liquide (mole.m ⁻³)
	H_{O_2}	Coefficient de Henry de l'oxygène (mole.m ⁻³ .Pa ⁻¹)
	$p_{O_2,G}$	Pression partielle en dioxyde de carbone dans la phase gaz (Pa)

1.3.3 Equilibres dynamiques du CO₂ en phase liquide

En phase liquide le dioxyde de carbone est impliqué dans des équilibres chimiques avec l'acide carbonique, les ions hydrogénocarbonates et les ions carbonates.

▪ Réaction d'hydratation du dioxyde de carbone

Les réactions impliquant le dioxyde de carbone, l'acide carbonique et l'ion hydrogénocarbonate sont classiquement représentés selon un schéma triangulaire (Figure 8) (Eigen et al., 1961).

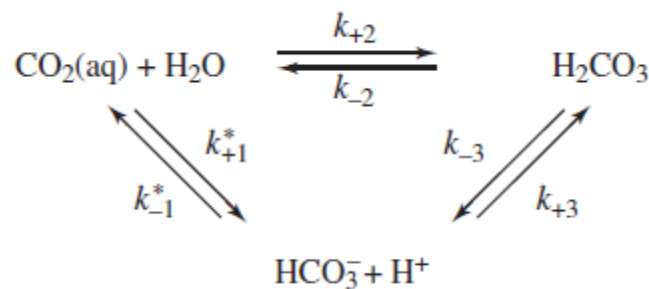


Figure 8. Réaction d'hydratation du dioxyde de carbone. Extrait de (Schulz et al., 2006).

Les constantes cinétiques k_{+1}^* et k_{-1}^* sont exprimées en s⁻¹ et m³.mole⁻¹.s⁻¹ respectivement. A 25°C la valeur des constantes k_{+1}^* et k_{-1}^* est de 3.7×10⁻² s⁻¹ et de 2.6×10⁴ m³.mole⁻¹.s⁻¹ respectivement (Schulz et al., 2006).

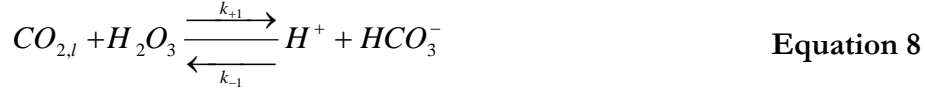
Les valeurs des constantes cinétiques k_{+2} et k_{-2} à 25°C rapportées dans la littérature sont 0.03 s⁻¹ et 20 s⁻¹ (Onken and Liefke, 1989), 2.5×10⁻³ s⁻¹ et 0.93 s⁻¹ (Jones and Greenfield, 1982), 0.0275 s⁻¹ et 80 s⁻¹ (Mils et Urey 1926), 0.0375 s⁻¹ et 13.7 s⁻¹ (Gibbons and Edsall, 1963). La réaction d'hydratation du dioxyde de carbone est donc lente par rapport à la réaction de déshydratation de l'acide carbonique menant à la production de dioxyde de carbone dissous.

La constante d'équilibre de la réaction d'hydratation du CO₂ K_a (adimensionnel) calculée à partir du ratio des constantes cinétiques k_{+2} et k_{-2} est faible ($K_a < 2.7 \times 10^{-3}$) ce qui est confirmé par la littérature. Le ratio entre la concentration d'acide carbonique et la concentration à l'équilibre est donc faible et on peut considérer que la concentration de l'acide carbonique à l'équilibre est négligeable.

Les constantes cinétiques k_{+3} et k_{-3} à 25°C sont 5×10⁷ m³.mole⁻¹.s⁻¹ et 10⁷ s⁻¹ (Gibbons and Edsall, 1963). L'équilibre entre l'acide carbonique et l'ion hydrogénocarbonate est donc quasi-instantané

et cette réaction peut être considérée à l'équilibre (Johnson, 1982). La constante d'équilibre $K_{H_2CO_3}$ correspondante est de l'ordre de $2.61 \times 10^{-4} \text{ mole.m}^{-3}$ et correspond à la constante réelle de dissociation de l'acide carbonique (Gibbons and Edsall, 1963; Kresnowati et al., 2008a).

Ce schéma triangulaire est donc regroupé en une réaction globale d'hydratation (Equation 8) (Johnson, 1982).



Les constantes cinétiques k_{+1} (en s^{-1}) et k_{-1} (en $m^3.mole^{-1}.s^{-1}$) sont définies par l'Equation 9 et l'Equation 10.

$$k_{+1} = k_{+1}^* + k_{+2} \quad \text{Equation 9}$$

$$k_{-1} = k_{-1}^* + \frac{k_{-2}}{K_{H_2CO_3}} \quad \text{Equation 10}$$

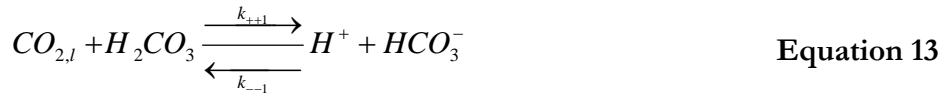
Le rapport des constantes cinétiques k_{+1} et k_{-1} correspond à la constante apparente d'équilibre K_1 ($mole.m^{-3}$) (Equation 11). Cette constante K_1 correspond au produit des constantes K_a et $K_{H_2CO_3}$.

$$K_1 = \frac{x_{H^+} \cdot x_{HCO_3^-}}{x_{CO_2}} \quad \text{Equation 11}$$

Pour des pH alcalins la réaction de formation d'hydrogénocarbonates par hydroxylation du dioxyde de carbone dissous doit être considérée (Gibbons and Edsall, 1963).



La réaction d'hydratation du dioxyde de carbone est alors décrite par l'Equation 13.



Les constantes cinétiques k_{+1} (en s^{-1}) et k_{-1} (en $m^3.mole^{-1}.s^{-1}$) sont définies par l'Equation 14 et l'Equation 15.

$$k_{-1} = k_{-1} \cdot x_{H^+} + k_{-4}$$

$$k_{+1} = k_{+1} + k_{+4} \cdot x_{OH^-} \quad \text{Equation 14}$$

$$k_{-1} = k_{-1} \cdot x_{H^+} + k_{-4} \quad \text{Equation 15}$$

L'influence de la composition du milieu sur les constantes d'équilibre est décrite dans l'annexe 2.

Les temps de relaxation des phénomènes biologiques étudiés étant plus importants que les temps de relaxation des réactions chimiques impliquées dans la réaction d'hydratation du CO_2 (Figure

8), il est raisonnable de considérer que ces réactions sont à l'état d'équilibre et que l'Equation 13 permet d'en faire une description globale.

▪ Réaction de formation de carbonates

Les ions hydrogénocarbonates sont impliqués dans une réaction d'équilibre chimique avec les ions carbonates. Les constantes cinétiques k_{+5} et k_{-5} à 25°C sont 17.66 s^{-1} et $5.0 \times 10^7 \text{ m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$ (Schulz et al., 2006). Le rapport des constantes cinétiques k_{+5} et k_{-5} correspond à la seconde constante apparente d'équilibre K_2 ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3}$) (Equation 17).



$$K_2 = \frac{x_{\text{H}^+} \cdot x_{\text{CO}_3^{2-}}}{x_{\text{HCO}_3^-}} \quad \text{Equation 17}$$

▪ Prédominance des formes

Le carbone inorganique total (CIT) est défini comme la somme des concentrations du dioxyde de carbone dissous en phase liquide, des ions hydrogénocarbonates et des ions carbonates (Equation 18).

$$x_{\text{CIT}} = x_{\text{CO}_2} + x_{\text{HCO}_3^-} + x_{\text{CO}_3^{2-}} \quad \text{Equation 18}$$

La répartition des formes entre les différentes espèces du système CIT dépend de la valeur du pH et des constantes d'équilibre. Les fractions en dioxyde de carbone, en ions hydrogénocarbonates et en ions carbonates sont alors exprimées par l'Equation 19, l'Equation 20 et l'Equation 21 respectivement.

$$f(\text{CO}_2) = \frac{10^{pK_1 - \text{pH}}}{10^{pK_1 - \text{pH}} + 1 + 10^{pH - pK_2}} \quad \text{Equation 19}$$

$$f(\text{HCO}_3^-) = \frac{1}{10^{pK_1 - \text{pH}} + 1 + 10^{pH - pK_2}} \quad \text{Equation 20}$$

$$f(\text{CO}_3^{2-}) = \frac{10^{pH - pK_2}}{10^{pK_1 - \text{pH}} + 1 + 10^{pH - pK_2}} \quad \text{Equation 21}$$

Les fractions des espèces du système dioxyde de carbone sont représentées en fonction du pH

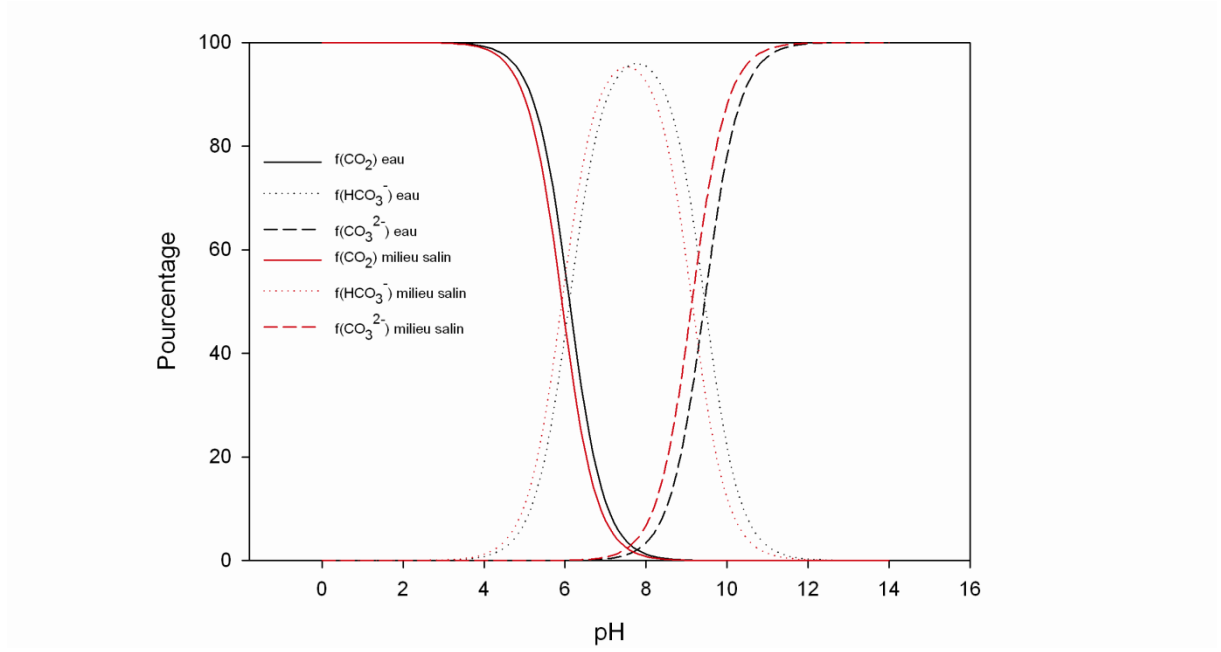


Figure 9. Prédominance des espèces du système dioxyde de carbone en fonction du pH dans l'eau et dans un milieu salin ($S = 20$ PSU, salinité comparable à un moût de fermentation).

Pour chacune des deux réactions globales du système CIT (Equation 8 et Equation 16) la répartition des formes des espèces impliquées est donc fonction du pH et de la valeur de la constante d'équilibre selon la relation d'Hendersson-Hasselbach (Equation 22 et Equation 23).

$$\log \left(\frac{x_{HCO_3^-}}{x_{CO_2}} \right) = pH - pK_1 \quad \text{Equation 22}$$

$$\log \left(\frac{x_{CO_3^{2-}}}{x_{CO_2}} \right) = pH - pK_2 \quad \text{Equation 23}$$

1.3.4 Transfert biomasse / liquide

Les différentes espèces du système CIT traversent la membrane plasmique par un mécanisme de diffusion (Jones and Greenfield, 1982). Lorsque la concentration intracellulaire en CO_2 est élevée il semble que la nucléation de bulles de CO_2 pur puisse se produire au sein de la phase biomasse (Swart et al., 2012). Le coefficient de perméabilité du dioxyde de carbone à travers la membrane plasmique est plus élevé que le coefficient de diffusion des ions hydrogénocarbonates et carbonates : $P_{CO_2}^M = 0.35 \times 10^{-2} \text{ m.s}^{-1}$ (Gutknecht et al., 1977) et $P_{HCO_3^-}^M = 10^{-10} \text{ m.s}^{-1}$ à 25°C (Jones and Greenfield, 1982). Il est donc courant dans la littérature de supposer que le dioxyde de carbone est la seule espèce du système CIT à diffuser à travers la membrane plasmique et donc à réaliser l'échange de CIT entre la phase biomasse et la phase liquide (Jones and Greenfield, 1982;

Kresnowati et al., 2008a). Cette hypothèse a été validée expérimentalement (Gutknecht et al., 1977).

La solubilité du dioxyde de carbone dans les membranes biologiques peut être approximée par le coefficient de partition octanol / eau comme cela est couramment supposé pour les acides faibles (Abbott et al., 2007).

$$\log P_{\text{octanol / eau}} = \log \left(\frac{[CO_2]_{\text{octanol}}}{[CO_2]_{\text{eau}}} \right) \quad \text{Equation 24}$$

Ce coefficient $\log P_{\text{octanol / eau}}$ est de 1.3 (Simon and Gutknecht, 1980) ce qui signifie que le dioxyde de carbone a une solubilité membranaire plus élevée que des acides faibles lipophiles comme l'acide acétique (-0.31) et l'acide propionique (0.33) mais plus faible que celle d'acides faibles fortement solubles dans la membrane plasmique comme l'acide sorbique (1.33) et surtout l'acide benzoïque (1.87) (Abbott et al., 2007).

Dans la phase liquide et la phase biomasse le dioxyde de carbone est impliqué dans les réactions d'équilibres chimiques avec les ions hydrogénocarbonate et carbonate. Ces équilibres sont soumis aux lois d'Henderson-Hasselbach (Equation 22 et Equation 23). En conditions de culture de levure le pH du milieu exocellulaire est mesuré et régulé à des valeurs inférieures à 7 alors que le pH cytosolique est régulé à des valeurs proches de 6.5-7 pour la levure *S. cerevisiae* (Faure, 2005; Kresnowati et al., 2007; Orii, 2010). Il est alors possible de calculer un facteur d'accumulation du CIT dans la phase biomasse par rapport à la phase liquide (Equation 25). En régime permanent les concentrations en CO_2 dissous dans la phase biomasse et dans la phase liquide sont identiques et l'équation peut alors être simplifiée (Equation 26). Le facteur d'accumulation F dépend uniquement de la valeur du pH intracellulaire, du pH exocellulaire et des constantes d'équilibre ; il est indépendant de la valeur de la concentration en CO_2 dissous dans la phase biomasse et la phase liquide. Si la valeur du pH exocellulaire est inférieure à celle du pH intracellulaire alors la valeur du facteur F est supérieure à l'unité.

$$F = \frac{x_{CIT \text{ intracellulaire}}}{x_{CIT \text{ exocellulaire}}} \quad \text{Equation 25}$$

$$F = \frac{x_{CO_2 \text{ intracellulaire}} \times \left(1 + 10^{pH \text{ intra} - pK_1} + 10^{2 \times pH \text{ intra} - pK_1 - pK_2} \right)}{x_{CO_2 \text{ extracellulaire}} \times \left(1 + 10^{pH \text{ exo} - pK_1} + 10^{2 \times pH \text{ exo} - pK_1 - pK_2} \right)} \quad \text{Equation 26}$$

En considérant ces hypothèses il est possible de calculer qu'une concentration en CO_2 dans la phase liquide de 2.99 mM (concentration à l'équilibre avec une phase gaz contenant 10% de CO_2 à 30°C sous une pression de 101325 Pa dans l'eau) correspondrait à une concentration identique en CO_2 intracellulaire et à une concentration intracellulaire en CIT de 13.13 mM. Si une salinité

de 20 g.L⁻¹ est considérée pour la phase liquide et la phase biomasse alors la concentration en CO₂ dans la phase liquide et dans la phase biomasse est de 2.71 mM (concentration à l'équilibre avec une phase gaz contenant 10% de CO₂ à 30°C sous une pression de 101325 Pa dans le milieu salin) et la concentration intracellulaire en CIT serait de 16.76 mM.

Dans le cas d'une production de CO₂ par le micro-organisme un gradient de concentration entre la phase biomasse et la phase liquide est nécessaire pour le processus de diffusion du CO₂. Le flux de diffusion du dioxyde de carbone à travers la membrane plasmique peut être calculé à partir de la perméabilité de ce composé (Kresnowati et al., 2008a). La concentration intracellulaire en dioxyde de carbone peut donc être recalculée si la concentration en CO₂ dans la phase liquide est connue.

1.3.5 Nucléation

La nucléation est définie comme l'ensemble des procédés menant à la formation de bulles de gaz au sein d'une phase liquide (Jones et al., 1999). La nucléation est un mécanisme possible de transfert du dioxyde de carbone de la phase liquide à la phase gaz. La nucléation de bulles de CO₂ est liée à la sursaturation de la phase liquide en dioxyde de carbone dissous (Voisin, 2005). Dans le cas de cultures microbiennes aérobies la probabilité d'occurrence de mécanismes de nucléation est infime. Les calculs sont détaillés dans l'annexe 3.

1.3.6 Transfert liquide / gaz

1.3.6.1 Cas général

La densité molaire du flux d'un composé A est exprimée par la première loi de Fick (Equation 27).

$$\vec{N}_A = -D_A \cdot \frac{\partial \vec{x}_A}{\partial z} \quad \text{Equation 27}$$

Avec N_A Densité de flux du composé A (mole.m⁻².s⁻¹)
 D Coefficient de diffusion dans la phase liquide (m².s⁻¹)
 x_A Concentration du composé A dans la phase liquide (mole.m⁻³)

L'établissement d'un bilan de matière sur un volume de liquide permet alors d'obtenir l'équation de continuité (Equation 28).

$$\frac{\partial \vec{x}_A}{\partial t} = -\vec{\nabla} \cdot \vec{N}_A + r_A \quad \text{Equation 28}$$

Avec r_A Terme de réaction (mole.m⁻³.s⁻¹)

En régime permanent, en l'absence de réaction et en considérant un transfert monodimensionnel selon un axe z l'Equation 28 est équivalente à l'Equation 29. La densité de flux de matière du

composé A serait alors constante selon l'axe z. Dans ce cas la concentration du composé A évolue de façon linéaire en fonction de la distance z.

$$\frac{\partial \vec{N}_A}{\partial z} = 0$$

Equation 29

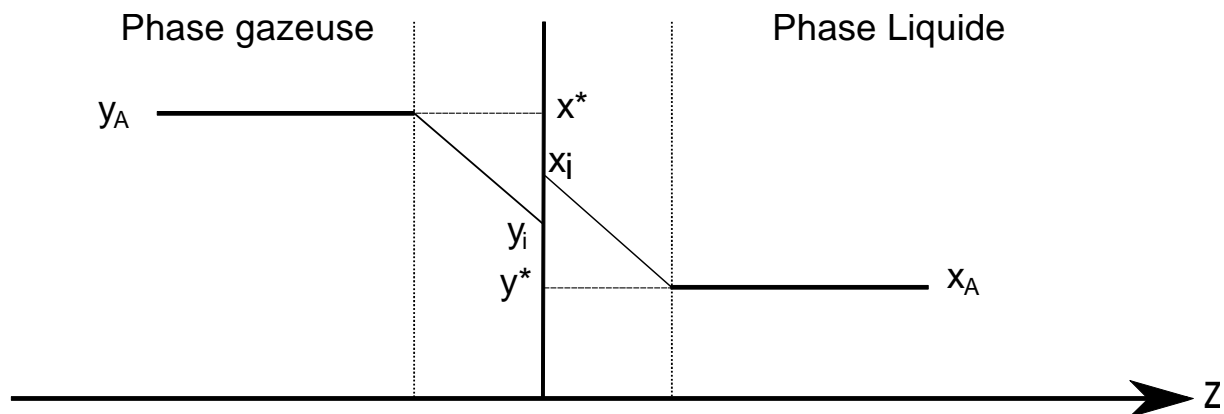
Le transfert d'un composé entre une phase gaz et une phase liquide est classiquement modélisé selon le modèle du double film de Lewis et Whitman (Figure 10). Ce modèle repose sur les hypothèses suivantes :

- les concentrations x et y sont homogènes sur l'ensemble de la phase liquide et de la phase gaz.
- Existence d'un film liquide et d'un film gaz de part et d'autre de l'interface liquide / gaz : couche limite
- Le régime d'écoulement dans la couche limite et le transfert de matière est conduit par un mécanisme de diffusion et non de transport
- A l'interface gaz / liquide il y a un équilibre entre le potentiel chimique d'un composé en phase liquide et le potentiel chimique de ce composé en phase gaz décrit par la loi de Henry (Equation 30).

$$x_A^i = RTH_A y_A^i$$

Equation 30

Avec	x_A^i	Concentration du composé A à l'interface (mole.m ⁻³)
	y_A^i	Concentration du composé A à l'interface (mole.m ⁻³)
	H_A	Coefficient de Henry pour le composé A (mole.m ⁻³ .Pa ⁻¹)
	R	Constante des gaz parfaits (J.mole ⁻¹ .K ⁻¹)
	T	Température (K)

**Figure 10.** Interface gaz / liquide selon le modèle du double film.

De façon pragmatique on introduit la notion de conductance de transfert afin d'exprimer que la densité de flux à l'interface est égal au produit des différences de concentration du composé entre le cœur de la phase liquide et l'interface et d'un coefficient propre à la nature de la phase. Il y a

conservation de la matière à l'interface gaz / liquide et donc la densité de flux dans le film gazeux est égale à la densité de flux dans le film liquide (Equation 31).

$$N_A = k_G(y_A - y_A^i) = k_L(x_A^i - x_A) \quad \text{Equation 31}$$

Avec	N_A	Densité de flux ($\text{mole.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$)
	y_A	Concentration du composé A au sein de la phase gazeuse (mole.m^{-3})
	y_A^i	Concentration du composé A à l'interface (mole.m^{-3})
	k_G	Conductance de transfert au sein de la couche limite gazeuse (m.s^{-1})
	x_A	Concentration du composé A dans la phase liquide (mole.m^{-3})
	x_A^i	Concentration du composé A à l'interface (mole.m^{-3})
	k_L	Conductance de transfert au sein de la couche limite liquide (m.s^{-1})

L'Equation 31 provient de l'intégration de l'Equation 27 sur le film gazeux et sur le film liquide avec comme conditions limites les valeurs des concentrations à l'interface et dans le cœur de la phase gaz et de la phase liquide. Il est donc possible d'exprimer le coefficient de transfert k_G dans le film gazeux par l'Equation 32 et le coefficient de transfert k_L dans le film liquide par l'Equation 33.

$$k_G = \frac{D_A^G}{\delta_G} \quad \text{Equation 32}$$

$$k_L = \frac{D_A^L}{\delta_L} \quad \text{Equation 33}$$

Avec	δ_G	Epaisseur de la couche limite gazeuse (m)
	δ_L	Epaisseur de la couche limite liquide (m)

Les concentrations à l'interface sont cependant difficiles à mesurer. On introduit donc la notion de conductance globale de transfert pour exprimer que la densité de flux est égale au produit du potentiel de transfert exprimé par rapport à la phase liquide ou à la phase gazeuse et d'un coefficient propre à la nature de la phase.

$$N_A = K_G(y_A - y_A^*) = K_L(x_A^* - x_A) \quad \text{Equation 34}$$

Avec	K_G	Conductance globale de transfert définie par rapport à la phase gazeuse (m.s^{-1})
	K_L	Conductance globale de transfert définie par rapport à la phase liquide (m.s^{-1})
	x_A^*	Concentration du composé A à l'interface en équilibre avec la phase gazeuse (mole.m^{-3})
	y_A^*	Concentration du composé A à l'interface en équilibre avec la phase gazeuse (mole.m^{-3})

Il est alors possible de définir les conductances globales de transfert par rapport à la phase gazeuse (Equation 35) et par rapport à la phase liquide (Equation 36). L'inverse de la conductance globale de transfert est alors défini comme une résistance globale au transfert égale à la résistance au transfert localisée dans le film gazeux est souvent négligée en raison de la faible

solubilité des composés étudiés. La conductance globale de transfert peut donc être approximée par la conductance de transfert dans le film liquide.

$$\frac{1}{K_G} = \frac{1}{k_G} + \frac{1}{H_A \cdot k_L} \quad \text{Equation 35}$$

$$\frac{1}{K_L} = \frac{1}{k_L} + \frac{H_A}{k_L} \quad \text{Equation 36}$$

L'aire interfaciale des contacteurs gaz-liquide est difficile à déterminer et il est alors impossible d'étudier le transfert d'un composé entre la phase gaz à la phase liquide en utilisant la densité de flux de transfert (Equation 34). Il est donc courant de considérer le flux volumique de transfert de la phase gaz à la phase liquide (Equation 37) correspondant à l'intégration de l'Equation 34 sur l'aire interfaciale du contacteur considéré. Le flux volumique de transfert correspond alors au produit d'un coefficient $K_L a$ caractérisant la dynamique du potentiel de transfert et de la différence de concentrations du composé considéré entre la phase gaz et la phase liquide caractérisant le potentiel de transfert.

$$\Phi_A = K_L \times a \times (x_A^* - x_A) \quad \text{Equation 37}$$

Avec Φ_A Flux volumique de transfert entre la phase gaz et la phase liquide ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{s}^{-1}$)
 $K_L a$ Coefficient volumique de transfert (s^{-1})

1.3.6.2 Facteurs influençant le $K_L a$

En réacteur agité aéré le coefficient de transfert $K_L a$ dépend :

- de la géométrie du réacteur
- des propriétés physico-chimiques du moût (masse volumique, tension de surface, viscosité, force ionique)
- des conditions opératoires (puissance dissipée, ventilation, température)
- de la présence éventuelle d'une accélération du transfert par voie chimique ou biologique

Le transfert d'oxygène de la phase gaz à la phase liquide a fait l'objet de nombreux travaux contrairement au transfert liquide / gaz du CO_2 . En effet, la solubilité de l'oxygène est faible alors que la vitesse de consommation d'oxygène peut atteindre jusqu'à $0.6 \text{ mole} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ en conditions de culture microbienne intensive (Fyferling et al., 2008). L'apport d'oxygène en phase liquide en continu au cours d'une culture est donc nécessaire afin d'éviter une limitation par ce substrat.

De nombreuses corrélations empiriques ont été proposées pour le $K_L a \text{ O}_2$ en réacteur agité aéré. Ces corrélations peuvent être exprimées sous forme dimensionnelles ou adimensionnelles (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009).

Les corrélations adimensionnelles expriment le $K_L a$ en fonction de nombres sans dimensions. Ces corrélations sont peu utilisées car des paramètres peuvent être impliqués dans plusieurs

termes de la corrélation avec des contributions contradictoires à la valeur du K_La : c'est par exemple le cas de la viscosité dans les corrélations de (Gabelle, 2012; Yagi and Yoshida, 1975). De plus certaines variables ne peuvent être utilisées dans une démarche de scale-up basée sur une valeur de K_La constante : c'est par exemple le cas de la vitesse d'agitation utilisée dans les corrélations de Yagi et Yoshida (Gabelle, 2012). Les corrélations dimensionnelles sont données sous la forme de l'Equation 38 et peuvent être employées dans une démarche de changement d'échelle (Gabelle, 2012).

$$K_La = c \times e^a \times Us^b$$

Equation 38

Avec	K_La	Coefficient volumique de transfert (s^{-1})
	C	Constante
	e	Puissance dissipée par unité de volume ($W.m^{-3}$)
	Us	Vitesse superficielle de ventilation ($m.s^{-1}$)

De nombreuses corrélations pour le calcul de K_La en réacteur agité aéré sont rapportées dans la littérature pour des milieux coalescents et non-coalescents (Tableau 8). Les corrélations empiriques rapportés dans le Tableau 8 ont été établies pour des réacteurs multi-étagés agités par des turbines Rushton, ce qui correspond à la configuration des réacteurs utilisés dans ce travail. L'influence de la puissance dissipée sur le K_La en réacteur agité aéré est prépondérante sur l'influence de la ventilation dans la mesure où la valeur de l'exposant a est généralement supérieure à la valeur de l'exposant b dans les corrélations empiriques définies dans le Tableau 8. Pour une puissance dissipée et une vitesse superficielle de ventilation données les valeurs de K_La calculées à partir de ces corrélations peuvent varier de façon importante surtout pour les milieux non-coalescents à forte puissance dissipée (Gogate et al., 2000). Ces variations proviennent principalement des différences dans la géométrie des réacteurs et dans les méthodes expérimentales utilisés pour le calcul des différentes corrélations (Gogate et al., 2000).

Les valeurs proposées par ces corrélations sont des valeurs globales de K_La sur l'ensemble du réacteur. En réalité la valeur du coefficient volumique de transfert n'est pas uniforme sur l'ensemble du volume du réacteur en raison de variations locales de la puissance dissipée et du hold-up. Dans le cas de réacteurs multi-étagés des corrélations ont été développées pour les étages individuels créés par la présence d'un mobile d'agitation à flux radial (Fujasová et al., 2007; Moucha et al., 2012). La valeur du K_La atteint en réacteur agité aéré dépendrait non seulement de la puissance dissipée mais aussi de la nature du ou des mobiles utilisés. Pour une puissance dissipée identique une configuration à trois turbines Rushton donne des K_La supérieurs de 15% aux K_La obtenus par l'association d'une turbine Rushton et de deux autres mobiles (Moucha et al., 2009).

Les différentes corrélations proposées dans la littérature pour des réacteurs multi-étagés ont été obtenues pour des puissances dissipées faibles : jusqu'à 7000 W.m^{-3} pour (Fujasová et al., 2007), 5000 W.m^{-3} pour (Moucha et al., 2009; Moucha et al., 2012), 6000 W.m^{-3} pour (Linek et al., 1996) et 4000 W.m^{-3} pour (Labík et al., 2014).

Tableau 8. Corrélations empiriques pour le calcul de $K_L a \text{ O}_2$ en réacteur agité aéré multi-turbines dans le cas de fluides newtoniens.

Corrélation	Conditions	Reference
$K_L a = 0.02 \times e^{0.4} \times U_s^{0.5}$	Air - Eau $20 \text{ L} < V_L < 2.6 \text{ m}^3$ Plusieurs configurations réacteur/mobiles	(Van't Riet, 1979)
$K_L a = 0.0177 \times e^{0.58} \times U_s^{0.588}$	Air - Eau 4 turbines Rushton 6 pales	(Moucha et al., 2003)
$K_L a = 0.002 \times e^{0.7} \times U_s^{0.2}$	Air - Milieu salin $20 \text{ L} < V_L < 2.6 \text{ m}^3$ Plusieurs configurations réacteur/mobiles	(Van't Riet, 1979)
$K_L a = 0.000416 \times e^{1.21} \times U_s^{0.4}$	Air - $0.3 \text{ M Na}_2\text{SO}_4$ $18 \text{ L} < V_L < 1.0 \text{ m}^3$ 3 turbines Rushton 6 pales	(Linek et al., 1994)

1.3.6.3 Analyse de l'impact de la puissance dissipée

L'influence prépondérante de la puissance dissipée sur les valeurs de $K_L a$ en réacteur agité aéré peut être décomposé en un impact sur le coefficient de transfert dans le film liquide k_L et un impact sur l'aire interfaciale a de la dispersion gaz / liquide.

1.3.6.3.1 Sur le coefficient de transfert dans le film liquide k_L

L'impact des conditions opératoires sur la valeur de la conductance k_L dans le film liquide peut être décrit par deux types de modèles : les modèles d'Eddy et les modèles de glissement.

Les modèles de glissement supposent que le transfert de matière à l'interface gaz / liquide dépend de la rigidité de cette interface. En réacteur agité aéré la vitesse d'une bulle a une composante radiale liée au mouvement du fluide et une composante axiale (slip velocity) qui est supposée égale à la vitesse limite d'ascension avec une correction pour la turbulence (Alves et al., 2004). La conductance dans le film liquide dépend alors du diamètre de bulle et de la vitesse d'ascension des bulles (Linek et al., 2008). Les bulles de faible taille ($< 2 \text{ mm}$) ou à l'interface contaminée par des polluants sont considérées rigides et la valeur de k_L est donnée par l'Equation 39. Pour les bulles de taille plus importante la conductance en film liquide est donnée par l'Equation 45.

$$k_L = 0.6 \times \sqrt{\frac{U_T}{d}} \times D^{2/3} \times \nu^{-1/6} \quad \text{Equation 39}$$

Avec U_T Vitesse limite (m.s⁻¹)
 d_B Diamètre de bulle (m)
 D Coefficient de diffusion (m².s⁻¹)
 ν Viscosité cinématique (m².s⁻¹)

$$k_L = 1.13 \times \sqrt{\frac{U_T}{d}} \times D^{1/2} \quad \text{Equation 40}$$

Dans les modèles d'eddy le transfert à l'interface dépend de la taille des tourbillons du champ d'écoulement turbulent. La taille de ces tourbillons est caractérisée par l'échelle de Kolmogorov et est très inférieure à la taille des bulles en réacteur agité aéré (Lamont and Scott, 1970). Ainsi donc la conductance du film liquide n'est pas dépendante de la taille de bulle et peut être calculée par l'Equation 41 pour des bulles à l'interface rigide et par l'Equation 42 pour des bulles à l'interface mobile.

$$k_L = C \times \left(\frac{e \times \nu}{\rho} \right)^{1/4} \times Sc^{-2/3} \quad \text{Equation 41}$$

$$k_L = C \times \left(\frac{e \times \nu}{\rho} \right)^{1/4} \times Sc^{-1/2} \quad \text{Equation 42}$$

Avec Sc Nombre de Schmidt (-)

1.3.6.3.2 Sur l'aire interfaciale / sur la dispersion gaz liquide

En réacteur agité aéré l'aire interfaciale est exprimé par l'Equation 43 (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009).

$$a = \frac{6 \times \varepsilon}{d_B} \quad \text{Equation 43}$$

Avec a aire interfaciale (m⁻¹)
 ε Rétention gazeuse (-)
 d_B Diamètre de bulle (m)

La puissance dissipée impacte l'aire interfaciale en changeant à la fois le diamètre des bulles de la dispersion gaz / liquide et la valeur de la rétention gazeuse.

Le diamètre des bulles de la dispersion gaz / liquide peut être calculée à partir de considérations théoriques ou mesuré. Le calcul du diamètre théorique de bulles en réacteur agité aéré se base sur les travaux réalisés pour le calcul du diamètre théorique de gouttes liquides (Hinze, 1955). Des forces antagonistes s'exercent à l'interface gaz / liquide : les forces de d'inertie liées au mouvement du fluide tendant à casser la goutte et des forces de tension de surface qui résistent à cette déformation (Parthasarathy et al., 1991). Le rapport de ces forces est caractérisé par le

nombre de Weber. La bulle se rompt lorsqu'elle atteint un diamètre maximal correspondant à un nombre de Weber critique (Équation 44).

$$We_c = \frac{\rho \cdot v^2 \cdot d_B^{\max}}{\sigma} \quad \text{Équation 44}$$

Avec	We_c	Nombre de Weber critique (adimensionnel)
	ρ	Masse volumique du liquide (kg.m^{-3})
	d_b^{\max}	Diamètre maximale de bulle (m)
	σ	Tension de surface (N.m^{-1})
	U	Gradient de vitesse sur la distance d_B ($\text{m}^2.\text{s}^{-2}$)

La vitesse U de fluctuation du liquide s'exprime par l'Équation 45 en considérant que les forces à l'origine de la rupture des bulles sont principalement dépendantes de la puissance dissipée (Garcia-Ochoa and Gomez, 2004; Parthasarathy et al., 1991).

$$U = C_1 (e \cdot d_B)^{\frac{2}{3}} \quad \text{Équation 45}$$

Avec	U	Gradient de vitesse sur la distance d_B ($\text{m}^2.\text{s}^{-2}$)
	e	Puissance dissipée (W.m^{-3})
	d_B	Diamètre de bulle (m)
	C_1	Constante (-)

Soit,

$$d_B^{\max} = C_2 \cdot \frac{\sigma^{\frac{3}{5}}}{e^{\frac{2}{5}} \cdot \rho^{\frac{2}{5}}} \quad \text{Équation 46}$$

Avec	ρ	masse volumique de la phase liquide (kg.m^{-3})
	σ	tension superficielle de la phase liquide (N.m^{-1})
	e	puissance dissipée par unité de volume (W.m^{-3})
	d_b^{\max}	diamètre maximal d'une bulle (m)
	C_2	constante égale à $(We/C_1)^{3/5}$ (adimensionnel)

Dans le cas d'un écoulement turbulent isotrope le nombre de Weber maximal est une constante (Garcia-Ochoa and Gomez, 2004). Il a été prouvé que dans le cas d'un écoulement à nombre de Reynolds infini le nombre de Weber d'une bulle de gaz est compris entre 2.7 et 2.8 (Parthasarathy et al., 1991). Le diamètre maximal de bulle peut alors calculé à partir de l'Équation 46.

Cette approche théorique est cependant peu utilisée et des corrélations empiriques basées sur des mesures directes de tailles de bulles en réacteur agité aéré ont été développées (Alves et al., 2002; Parthasarathy et al., 1991). La mesure des tailles de bulles de gaz en réacteur agité peut être réalisée par des techniques invasives (sonde capillaire, sonde conductimétrique) ou par des méthodes indirectes comme l'analyse d'images en paroi (Tableau 10). Les techniques de type CSP (Capillary Suction Probe) sont principalement limitées par le diamètre du capillaire tandis ce que les méthodes de type DI (Digital Imaging) sont limitées par la résolution de la caméra utilisée et

par les méthodes algorithmiques d'identification des contours des bulles sur les images (Laakkonen et al., 2005).

En réacteur agité aéré il existe une hétérogénéité des tailles de bulles qui peut être présentée en termes de diamètres, de surface et de volume de bulle. Classiquement le diamètre d_{10} et le diamètre d_{32} dit de Sauter sont utilisés pour caractériser une distribution de tailles de bulles en réacteur. Ces diamètres sont calculés à partir des données de mesures de tailles de bulles : les tailles de bulles sont discrétisées en classes et le nombre de bulles mesuré pour chaque classe est pris en compte (Équation 47). Le diamètre moyen de bulle d_{32} est directement proportionnel au diamètre d_{\max} (Équation 46) (Alves et al., 2002) et correspond au diamètre de la bulle dont le ratio volume / surface est équivalent à celui de la distribution. Le diamètre d_{32} est donc différent du diamètre moyen arithmétique d_{10} qui correspond à la moyenne du diamètre de toutes les bulles présentes dans la distribution (Equation 48). Ainsi on distingue les distributions de tailles de bulles basées sur le nombre de bulles (paramètre caractéristique d_{10}) et les distributions de taille de bulles basées sur le volume (paramètre caractéristique d_{32}) (Laakkonen et al., 2005)

$$d_{32} = \frac{\sum_{i=1}^{i=nb} ni.di^3}{\sum_{i=1}^{i=nb} ni.di^2} \quad \text{Équation 47}$$

$$d_{10} = \frac{\sum_{i=1}^{i=nb} ni.di^1}{nb} \quad \text{Equation 48}$$

Avec n_b Nombre de bulles
 n_i Nombre de bulles dans la classe i
 d_i Diamètre de bulle caractéristique de la classe i

Plusieurs corrélations ont été décrites dans la littérature pour le calcul du diamètre d_{32} en réacteur agité aéré (Tableau 9).

Tableau 9. Corrélations pour le calcul du diamètre moyen de bulle en réacteur agité aéré.

Conditions	Expression	Référence
Milieu coalescent, $e \in [2000 ; 8000] \text{ W.m}^{-3}$	$d_{32} = 0.014e^{-0.37}$	(Alves et al., 2002)
Milieu non coalescent ionique (Na_2SO_4 0.3 M), $e \in [2000 ; 8000] \text{ W.m}^{-3}$	$d_{32} = 0.0076e^{-0.14}$	(Alves et al., 2002)
Milieu visqueux	$d_{32} = 0.7 \frac{\sigma^{0.6}}{e^{0.4} \rho^{0.2}} \left(\frac{\mu_L}{\mu_G} \right)^{0.1}$	(Bhavaraju et al., 1978)

Milieu coalescent,
 $e \in [0 ; 5000] \text{ W.m}^{-3}$

$$d_{32} = 2 \frac{\sigma^{3/5}}{e^{2/5} \rho^{1/5}}$$

(Parthasarathy et al., 1991)

Les mesures expérimentales de tailles de bulles en réacteur agité aéré montrent cependant que les distributions locales de tailles de bulles ne sont pas uniformes dans le réacteur et sont asymétriques (Barigou and Greaves, 1992; Laakkonen et al., 2005; Machon et al., 1997). Ainsi pour un réacteur mono turbine opéré à une puissance dissipée d'environ 2 kW.m^{-3} les tailles de bulles s'échelonnent localement de 0.5 à 6 mm en milieu coalescent et de 0.5 à 3 mm en milieu non coalescent (Barigou and Greaves, 1992). Les distributions globales de tailles de bulles obtenues sont fortement asymétriques pour le milieu non coalescent : car plus de la moitié des bulles ont un diamètre inférieur à 1 mm. De même pour un réacteur mono turbine opéré à une puissance dissipée d'environ 1 kW.m^{-3} et à 1 vvm les tailles de bulles s'échelonnent de 40 μm à 8 mm en milieu coalescent et non coalescent (Machon et al., 1997). Dans ces conditions 50% du nombre total de bulles ont un diamètre inférieur à 400 μm en milieu coalescent ou non coalescent. La technique utilisée est l'analyse d'image qui est plus sensible que la capture de bulles utilisée dans (Barigou and Greaves, 1992) et permet donc de détecter des bulles plus fines (Tableau 10).

Les distributions de tailles de bulles en réacteur agité aéré ont été modélisées par des lois de type Weibull pour une dispersion eau/air et de type exponentiel pour une dispersion électrolyte air (Barigou and Greaves, 1992) et par une loi de type log-normale pour un milieu eau/air (Cents et al., 2005; Schumpe and Deckwer, 1979). Ces modélisations considèrent une distribution de tailles de bulles homogène sur l'ensemble du réacteur. En réalité la forme de la distribution de taille de bulles (BSD) varie en fonction de l'emplacement dans le réacteur : en milieu coalescent elle est fortement asymétrique au voisinage des mobiles d'agitation mais l'asymétrie diminue au niveau de la paroi où des phénomènes de coalescence peuvent se produire (Barigou and Greaves, 1992). Ceci explique les BSD locales soient plus homogènes dans le cas d'un milieu non coalescent (Barigou and Greaves, 1992). Les variations locales de BSD observées par Laakkonen sont plus faibles (Laakkonen et al., 2005).

L'effet de la puissance dissipée et du débit de ventilation dépendent également de l'emplacement considéré dans le réacteur. Ainsi en milieu coalescent une augmentation de la vitesse d'agitation entraîne un déplacement des BSD vers de plus faibles diamètres de bulles indépendamment de l'emplacement dans le réacteur (Barigou and Greaves, 1992). Toutefois l'asymétrie des BSD locales est diminuée au voisinage des mobiles d'agitation et conservée au niveau des parois en

milieu coalescent. Les données de Laakkonen suggèrent au contraire une augmentation de l'asymétrie de la BSD au voisinage de la turbine Rushton lorsque la vitesse d'agitation augmente de 260 rpm à 490 rpm (Laakkonen et al., 2005). Le diamètre moyen d_{32} est faible au niveau des mobiles d'agitation, augmente dans le flux de décharge des mobiles d'agitation à débit radial et est le plus élevée en paroi tant pour des milieux coalescents que pour des milieux non coalescents (Alves et al., 2002; Barigou and Greaves, 1992; Laakkonen et al., 2005). Le diamètre de bulle d_{32} dans la région des mobiles d'agitation augmente avec la vitesse d'agitation en raison d'une augmentation du cisaillement des bulles issues du diffuseur (Alves et al., 2002; Barigou and Greaves, 1992). Cette diminution du volume de bulle avec l'augmentation de la puissance dissipée est observée en milieux coalescent et en milieu non coalescent pour de faibles débits de ventilation : 0.1 vvm environ pour (Barigou and Greaves, 1992) et 0.25-0.5 vvm pour (Alves et al., 2002). Elle n'est plus observée en milieu coalescent pour des débits de ventilation supérieurs (0.47 vvm) en raison de l'augmentation du flux de gaz passant à travers le mobile d'agitation inférieur (Barigou and Greaves, 1992).

La plupart des mesures expérimentales de BSD ont été réalisées en milieu coalescent mais la présence de solutés peut impacter les tailles de bulles en réacteur agité aéré notamment via de changements dans la force ionique du milieu et la tension de surface du milieu. Ainsi il a été montré qu'une force ionique 0.2 M provoquait une réduction de 50% de la coalescence indépendamment de la nature des ions (Lessard and Zieminski, 1971). Des concentrations élevées en Na_2SO_4 (0.2-1.0M) sont donc utilisées pour la détermination des coefficients volumiques de transfert en milieu non coalescent. La réduction des propriétés de coalescence impacte les distributions de tailles de bulles en réacteur agité aéré. Ainsi il a été montré que le diamètre d_{32} calculé à partir de mesures en réacteur agité aéré en milieu coalescent est plus important que le diamètre calculé en milieu salin partiellement coalescent et en milieu non coalescent (Machon et al., 1997). Les données de (Barigou and Greaves, 1992) obtenues en milieu partiellement coalescent ($I = 0.15\text{M}$) montrent que la présence d'électrolytes provoque i) un déplacement des BSD locales vers des diamètres plus faibles que les BSD obtenues dans des conditions similaires en milieu coalescent ii) une augmentation apparente de l'asymétrie des BSD locales par rapport aux les BSD obtenues dans des conditions similaires en milieu coalescent iii) une homogénéisation des BSD locales.

De même la tension de surface est susceptible d'impacter les distributions de tailles de bulles en réacteur agité aéré de par la loi de Laplace (Equation 49).

$$d = \frac{2 \times \sigma}{\Delta P}$$

Equation 49

Avec	d	Diamètre de bulle (m)
	σ	Tension de surface (N.m ⁻¹)
	ΔP	Différence de pression entre l'intérieur de la bulle et le milieu externe (Pa)

Il a toutefois été suggéré que la tension de surface ne serait pas un paramètre déterminant pour la taille des bulles en réacteur agité aéré (Machon et al., 1997). Ainsi Machon n'observe pas de différences entre les diamètres d₃₂ calculés en milieu coalescent ($\sigma = 72 \text{ N.m}^{-1}$) et dans une solution de 0.2 M butanol ($\sigma = 45 \text{ N.m}^{-1}$).

Tableau 10. Techniques de mesure de tailles de bulles en réacteur agité aéré.

Technique	Principe	Précision	Avantages	Inconvénients	Référence
Capillary suction probe	Prélèvement de la bulle par un capillaire. Mesure de la longueur du volume gazeux obtenu dans le capillaire par spectrophotométrie.	300 μm – 7 mm	> 40 μm	Méthode invasive : perturbation de l'écoulement ? Prélèvement continu : nécessite un volume important et une viscosité faible du moût. Sensible à l'orientation de la sonde capillaire	(Alves et al., 2002; Barigou and Greaves, 1992; Laakkonen et al., 2005)
Digital Imaging (DI)	Identification de la taille des bulles par traitement d'images.	> 40 μm	Non invasive	Applicable seulement près des parois et sur des dispersions claires et peu denses	(Bouaifi M. et al., 2001; Machon et al., 1997; Parthasarathy et al., 1991)
CSP/DI	Prélèvement par sonde capillaire. Transfert des bulles dans une chambre de mesure. Mesure par DI.	> 40 μm	> 40 μm	Méthode invasive : perturbation de l'écoulement ? Prélèvement continu : nécessite un volume important et une viscosité faible du moût. Sensible à l'orientation de la sonde capillaire	(Grau and Heiskanen, 2002)
Sonde conductimétrique		980	Distribution locale de tailles de bulles sur l'ensemble de la phase liquide	Méthode invasive : perturbation de l'écoulement ? - Lente	(De Figueiredo, 1978)

1.3.6.4 Influence de l'accélération : chimique ou biologique

L'accélération du transfert gaz / liquide d'oxygène en présence d'une réaction simultanée de l'oxygène dans la phase liquide est connu de longue date. Cette réaction peut être chimique ou biologique et peut influencer sur le transfert gaz / liquide de l'oxygène. Le cas d'une accélération par une réaction chimique dans la phase liquide est détaillé dans l'annexe 4.

La consommation d'oxygène par la biomasse présente dans la couche limite liquide lors d'une culture microbienne aérobie intensive peut conduire à une accélération du transfert liquide / gaz du transfert d'oxygène (Garcia-Ochoa et al., 2010; Merchuck, 1977). La réaction de consommation d'oxygène est considéré d'ordre 1 par rapport à la concentration en biomasse dans le film liquide et d'ordre zéro par rapport à la concentration en oxygène dissous (Equation 50) (Merchuck, 1977). La distribution de la concentration en biomasse dans le film liquide est inconnue et seules des hypothèses peuvent être formulées par rapport à la concentration en biomasse au cœur de la phase liquide (Merchuck, 1977).

$$D_A \frac{d^2 x_A}{dz^2} = \frac{d^2 x_A}{dt} - X \times q_A \quad \text{Equation 50}$$

Avec $[X]$ Concentration en biomasse dans la couche limite liquide ($\text{mole}_X \cdot \text{m}^{-3}$)

q_A Vitesse spécifique de consommation du composé A ($\text{mole} \cdot \text{mole}_X^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$)

La résolution de cette équation permet d'obtenir le profil de la concentration en oxygène dissous en fonction de z (Equation 51). La densité de flux de transfert de l'oxygène en présence d'une réaction simultanée de consommation dans la couche limite peut alors être calculée par l'Equation 27. Le facteur d'accélération E du transfert gaz / liquide du composé A par rapport à une absorption sans réaction chimique simultanée est alors obtenu par l'Equation 52 équivalente à l'Equation 53.

$$x = \left(\frac{X \times q_A}{2 \times D_A} \right) \cdot z^2 + \left(\frac{2 \times x_L \times D_A - X \times q_A \times \delta^2 - 2 \times x_A^* \times D_A}{2 \times \delta \times D_A} \right) \times z + x_A^* \quad \text{Equation 51}$$

$$E = \frac{D_A \times X \times q_A}{k_L^2 \times x_{O_2}^*} \quad \text{Equation 52}$$

$$E = 1 + Ha^2 \quad \text{Equation 53}$$

1.3.7 Transfert liquide / gaz du CO_2

1.3.7.1 Analogie avec le transfert gaz / liquide de l'oxygène

Le transfert liquide / gaz du CO_2 a été modélisé par analogie avec le transfert gaz / liquide de l'oxygène (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977).

La résistance au transfert localisée dans le film gazeux est couramment négligée dans le cas de l'absorption de l'oxygène dans la mesure où ce composé est peu soluble dans l'eau : H_{O_2} est égale à $1.206 \cdot 10^{-5} \text{ mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$ à 30°C . Or le CO_2 est 23.14 fois plus soluble dans l'eau que l'oxygène : à 30°C H_{CO_2} est égale à $2.791 \cdot 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$. Il convient alors de se demander si une telle simplification est possible dans le cas de l'étude du transfert liquide / gaz du CO_2 . Le coefficient de diffusion du CO_2 à 30°C est de $2.25 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'eau pure et de $1.70 \cdot 10^{-5} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ dans l'air. La solubilité du CO_2 dans l'eau pure à 30°C est de $2.782 \cdot 10^{-4} \text{ mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$. Les conductances de transfert atteintes en conditions de culture microbienne sont de l'ordre de $5 \cdot 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ (Fyferling, 2007). La résistance au transfert du CO_2 localisée dans la couche limite gazeuse serait du même ordre de grandeur que la résistance au transfert localisée dans le film liquide si l'épaisseur du film gazeux autour de chaque bulle était de 50 cm. Comme dans le cas de l'absorption de l'oxygène la résistance au transfert localisée dans la couche limite gazeuse peut être donc négligée dans le cadre de l'étude du transfert liquide / gaz du CO_2 (Kordač and Linek, 2008; Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977).

Il est couramment considéré que l'aire interfaciale est identique pour le transfert gaz / liquide de l'oxygène et le transfert liquide / gaz du CO_2 . c'est-à-dire que la désorption du CO_2 ne s'effectue pas par nucléation (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977). La conductance globale de transfert K_L est cependant différente pour les deux composés car la conductance dans le film liquide k_L dépend du coefficient de diffusion (Equation 33). Il est possible d'estimer le coefficient volumique de transfert pour le CO_2 à partir de la valeur du coefficient volumique de transfert pour l'oxygène en tenant compte de la différence dans les valeurs de coefficients de diffusion (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977). Cette correction varie selon la dépendance du coefficient de transfert dans le film liquide vis-à-vis du coefficient de diffusion et donc du modèle choisi pour la dépendance de la conductance dans le film liquide vis-à-vis du coefficient de diffusion (Equation 39, Equation 40, Equation 41, Equation 42) (Linek et al., 2005). Dans le cas d'une culture microbienne aérobie intensive les puissances dissipées utilisées pour éviter une limitation en oxygène sont importantes et les tailles de bulle atteintes sont faibles ($<1 \text{ mm}$) (Fyferling, 2007). Les bulles sont alors considérées comme rigides et le coefficient de transfert du CO_2 en phase liquide peut être calculé à partir du coefficient de transfert de l' O_2 en phase liquide (Equation 54) (Royce, 1992). Le ratio des coefficients de diffusion est indépendant de la température.

$$\frac{k_L(\text{CO}_2)}{k_L(\text{O}_2)} = \left(\frac{D_{\text{CO}_2}^L}{D_{\text{O}_2}^L} \right)^{2/3}$$

Equation 54

A 30°C les coefficients de diffusion de l'oxygène et du dioxyde de carbone dans l'eau pure sont respectivement de $2.569 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et $2.25 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Green and Perry, Wilke and Chang, 1955). Le coefficient volumétrique de transfert pour le CO_2 peut donc être estimé à partir du coefficient volumétrique de transfert pour l'oxygène selon l'Equation 55. Cette approximation est couramment utilisée dans le domaine du génie microbiologique (Bloemen et al., 2003; Frahm et al., 2002; de Jonge et al., 2014; Wu et al., 2003)

$$K_L a(\text{CO}_2) = 0.89 \times K_L a(\text{O}_2) \quad \text{Equation 55}$$

Pour des cultures aérobies limitées en carbone où la quantité d'oxygène consommée est proche de la quantité de CO_2 produit Royce et Thornhill proposent une estimation du gradient de CO_2 entre la phase liquide et la phase gaz à partir de l'Equation 55 (Royce and Thornhill, 1991). Le facteur d'excès ξ caractérise le ratio entre la concentration en CO_2 dissous calculée à partir de la mesure de la fraction en CO_2 dans les gaz de sortie en utilisant le $K_L a(\text{CO}_2)$ défini par l'Equation 55 et la concentration en CO_2 dissous calculée en supposant l'équilibre thermodynamique avec la phase gaz (Equation 56).

$$\xi = \frac{[\text{CO}_{2,l}]}{[\text{CO}_{2,l}]_{eq}} \approx 1 + \frac{Q \times H_{\text{CO}_2}}{60 \times R \times T \times (0.89 \times K_L a_{\text{O}_2})} \quad \text{Equation 56}$$

Le facteur d'excès en CO_2 dans la phase liquide diminue donc lorsque le $K_L a$ pour l'oxygène augmente et augmente lorsque le débit de ventilation augmente. On remarquera que les auteurs considèrent le $K_L a$ de l'oxygène comme indépendant du débit de ventilation. De plus, le facteur d'excès diminue avec l'augmentation de la fraction en CO_2 dans les gaz de sortie. En conclusion, pour des coefficients volumiques de transfert de l'oxygène élevés et des fractions en CO_2 dans les gaz de sortie élevées le facteur d'excès ξ est proche de 1. Il est alors raisonnable de supposer l'équilibre thermodynamique entre la phase liquide et la phase gaz.

1.3.7.2 Etude du transfert interphasique du CO_2 en l'absence de réaction biologique

Le transfert liquide / gaz du CO_2 a fait l'objet d'étude en maquettes froides en réacteur agité aéré, c'est-à-dire en milieux modèles de fermentation sans activité biologique ni présence de biomasse (Gray et al., 1996; Hill, 2006; Kordač and Linek, 2008; Matsunaga et al., 2009a; Matsunaga et al., 2009b; Puskeiler et al., 2012; Sieblis et al., 2011). La concentration en CO_2 dans la phase liquide est estimée à partir d'une mesure de variation de pH du milieu suite à des incréments de la pression partielle en CO_2 dans la phase gaz (Hill, 2006; Kordač and Linek, 2008; Sieblis et al., 2011) ou directement par une sonde dédiée (Matsunaga et al., 2009a; Matsunaga et al., 2009b; Puskeiler et al., 2012).

L'utilisation d'une sonde CO_2 pour une estimation du coefficient volumique de transfert du CO_2 par la méthode dynamique est possible pour des procédés peu intensifs caractérisés par des valeurs de K_{La} faibles et correspondant à des conditions de culture de cellules de mammifères. Dans ce cas la dynamique de réponse du capteur caractérisée par la valeur de sa constante de temps (50-200s) peut suffire pour caractériser le phénomène physique de désorption lent. Les valeurs de K_{La} pour le CO_2 rapportées par (Matsunaga et al., 2009a; Matsunaga et al., 2009b) sont extrêmement faibles ($<1.5 \text{ h}^{-1}$) et aucune comparaison n'est proposée entre les coefficients volumiques de transfert pour l'oxygène et le CO_2 . Puskeiler propose une détermination des coefficients volumiques de transfert pour l'oxygène et le CO_2 dans le cas d'une absorption simultanée de ces deux composés dans un milieu modèle sous différentes conditions d'agitation et de ventilation (Puskeiler et al., 2012). La méthode proposée tient compte de la dynamique de réponse du capteur mais ne considère pas l'évolution du gradient de concentration gaz / liquide au cours de l'absorption. Les K_{La} rapportés pour le CO_2 ($1.5\text{-}4 \text{ h}^{-1}$) sont plus faibles que ceux atteints pour l'oxygène ($0.5\text{-}15 \text{ h}^{-1}$) et le ratio entre le $K_{\text{La}} \text{ CO}_2 / K_{\text{La}} \text{ O}_2$ diminue lorsque la vitesse d'agitation augmente.

Les sondes pH ont une constante de temps faible ($<2\text{s}$) et peuvent donc être utilisées pour la détermination du coefficient volumique de transfert du CO_2 par la méthode dynamique dans le cas d'une expérience d'absorption du CO_2 (Kordač and Linek, 2008). Un modèle pour la détermination du K_{La} pour le CO_2 en réacteur agité aéré en fonction de la vitesse d'agitation, du débit de ventilation et de la température a été proposé par Hill (Hill, 2006). Ce modèle tient compte des équilibres chimiques en phase liquide du CO_2 . Aucune comparaison avec des valeurs expérimentalement mesurées du coefficient volumique de transfert pour l'oxygène n'est cependant proposée et les valeurs de K_{La} pour le CO_2 atteintes sont faibles ($<150 \text{ h}^{-1}$). De plus, l'auteur rapporte une diminution des valeurs mesurées de K_{La} pour le CO_2 en présence de $28.5 \text{ g.L}^{-1} \text{ NaCl}$ ce qui est inattendu au regard de la littérature sur l'influence de la salinité sur les coefficients volumiques de transfert. Il a été démontré que ce résultat était lié à la non prise en compte par Hill de la diminution de la concentration en CO_2 dans la phase gaz du fait du transfert de ce composé de la phase gaz à la phase liquide (Kordač and Linek, 2008). En effet la solubilité importante du CO_2 en phase liquide entraîne une forte réduction du potentiel de transfert au cours d'une expérience d'absorption qui ne serait pas aussi prononcée dans le cas d'une absorption d'oxygène. Considérer le potentiel de transfert constant pour le CO_2 causerait une sous-estimation du coefficient volumique de transfert déterminé par cette expérience d'absorption. Les K_{La} mesurés pour des expériences d'absorption du CO_2 ou de l'oxygène sont faibles ($<5\text{h}^{-1}$) mais proches (Kordač and Linek, 2008). Enfin, la détermination des coefficients

volumiques de transfert pour le CO₂ et l'oxygène a été proposée dans le cas d'un transfert croisé de ces deux composés en réacteur agité aéré : absorption de l'oxygène et désorption du CO₂ (Sieblist et al., 2011). Les résultats montrent que le K_La pour l'oxygène augmente de 25 h⁻¹ à 45 h⁻¹ lorsque la puissance dissipée augmente de 100 à 500 W.m⁻³ alors que le K_La pour le CO₂ reste constant. En revanche le K_La pour le CO₂ augmente de 18 h⁻¹ à 35 h⁻¹ lorsque le débit de ventilation augmente de 3.25 à 9.00 NL.min⁻¹ quelque que soit la puissance dissipée par l'agitation. Ces résultats confirment donc que le K_La pour le CO₂ dépend plus de la ventilation que de la puissance dissipée comme proposé par (Puskeiler et al., 2012).

Le transfert croisé liquide / gaz pour le CO₂ et gaz / liquide pour l'oxygène a fait l'objet de deux études de modélisation qui permettent d'identifier les mécanismes à l'origine des phénomènes observés par les études précédemment citées (Gray et al., 1996; Sieblist et al., 2011). L'étude de Gray s'intéresse à la désorption du CO₂ et à l'absorption simultanée d'oxygène apporté sous forme de microbulles d'O₂ pur dans un réacteur à perfusion (Gray et al., 1996). Le calcul des flux de transfert croisés de l'O₂ et du CO₂ au cours de l'ascension d'une bulle montre que le flux de transfert de l'O₂ est plus important que celui du CO₂ au début de l'ascension de la bulle en raison d'un gradient de concentration plus élevé. Cependant les conditions expérimentales rapportées ne permettent pas de calculer un gradient de concentration gaz / liquide de l'oxygène est plus important que le gradient liquide / gaz du CO₂. Ce travail montre néanmoins l'intérêt de considérer les flux de transfert croisés CO₂/O₂ car le transfert du CO₂ pourrait être impacté par le transfert de l'oxygène et s'inverser au cours de l'ascension de la bulle. De plus, les auteurs démontrent que la contribution d'une bulle à la désorption du CO₂ dépend de son diamètre et que les bulles de faible diamètre contribuent peu à la désorption du CO₂ en raison d'un effet de saturation. L'étude de Sieblist reprend ce raisonnement et montre que la désorption du CO₂ est étroitement liée au temps de séjour des bulles dans le réacteur (Sieblist et al., 2011). La forte solubilité du CO₂ en phase liquide crée un gradient de concentration important entre la phase liquide et la phase gaz entraînant un flux de transfert liquide / gaz du CO₂ plus important que le flux inverse de transfert de l'oxygène dans les premiers moments d'ascension de la bulle. Les bulles en ascension dans le fermenteur sont alors susceptibles d'être saturées si leur temps de séjour est supérieur au temps nécessaire pour atteindre l'équilibre entre la bulle et la phase liquide : les bulles saturées ne peuvent alors plus contribuer à la désorption du CO₂ (Sieblist et al., 2011). Ce phénomène expliquerait l'apparente indépendance du K_La CO₂ vis-à-vis de la vitesse d'agitation : une augmentation de la puissance dissipée diminue le diamètre moyen des bulles, donc augmente le phénomène de saturation de ces bulles par le CO₂ et ne contribue en rien à augmenter la désorption du CO₂ (Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011). L'influence du débit

de ventilation sur le $K_L a_{CO_2}$ proviendrait de l'augmentation du nombre de bulles dans le réacteur pour un diamètre moyen de bulles donné. Il faut toutefois souligner que les auteurs ne vérifient pas la validité de leurs hypothèses par le calcul. En particulier le temps nécessaire à la saturation d'une bulle par le CO_2 dépend non seulement du gradient de concentration de ce composé entre la phase liquide et la phase gaz mais aussi du volume de la bulle et donc de son diamètre. Or les auteurs ne vérifient pas quantitativement que les faibles $K_L a_{CO_2}$ observés sont liés à une limitation de la capacité de désorption du CO_2 par la saturation des bulles d'air en ascension dans le fermenteur.

Enfin, l'impact du transfert croisé O_2/CO_2 a été souligné dans une étude sur l'absorption de l'oxygène dans des solutions saturées en CO_2 (Devatine et al., 2007). Une concentration élevée en CO_2 dissous crée un fort gradient de transfert liquide / gaz du CO_2 et donc un flux de transfert plus important que le flux croisé d' O_2 lors de l'ascension d'une bulle d'air. La concentration en oxygène dans la phase gaz diminue donc au cours de l'ascension de la bulle du fait du transfert gaz / liquide mais aussi de la dilution créée par le transfert liquide / gaz du CO_2 .

Les études en maquette froide rapportées dans la littérature montrent donc que le coefficient volumique de transfert du CO_2 peut être inférieur à la valeur prédite en utilisant l'Equation 55 et le coefficient volumique de transfert de l'oxygène obtenu dans les mêmes conditions en réacteur agité aéré. La dépendance du $K_L a_{CO_2}$ vis-à-vis du débit de ventilation et son apparente indépendance vis-à-vis de la puissance dissipée ont également été soulignés. Ces résultats seraient liés à une saturation par le CO_2 des bulles d'air en ascension dans le fermenteur, limitant les capacités de désorption de ce composé. Il faut remarquer que ces études en maquette froide ont été réalisées dans des milieux simples (eau ou eau + NaCl), en l'absence de réaction biologique, le plus souvent sans considération du transfert croisé O_2/CO_2 et pour des puissances dissipées et des débits de ventilation faibles emmenant à des coefficients volumiques de transfert très inférieurs à ceux atteints lors de cultures microbiennes intensives (Fyferling et al., 2008).

1.3.7.3 Etude du transfert interphasique du CO_2 lors de cultures microbiennes

Peu d'études rapportent la caractérisation du coefficient volumique de transfert du CO_2 en condition de cultures microbienne car ce calcul nécessite une mesure de la concentration en CO_2 dissous. Cette mesure a pu être réalisée en cours de cultures en utilisant la méthode du silicone tubing (Dahod, 1993; Yagi and Yoshida, 1977), des sondes stérilisables basées sur le principe de Severinghaus (Baez et al., 2009; Hiltbrunner and Zizek, 2006; Ho and Smith, 1986; Ju et al., 1991; Kresnowati et al., 2008b; McIntyre and McNeil, 1997a; McIntyre and McNeil, 1997b; McIntyre and McNeil, 1997c; Severinghaus and Bradley, 1958; Sherstobitova and Bylinkina, 1977;

Srinivasan et al., 2012) ou des sondes stérilisables à fluorescence (El-Sabbagh et al., 2006; El-Sabbagh et al., 2008; Pattison et al., 2000). Dans plusieurs cas cette mesure de la concentration en CO_2 en phase liquide est couplée à une mesure de la fraction en CO_2 dans les gaz de sortie permettant ainsi le calcul du coefficient volumique de transfert du CO_2 par les auteurs (Hiltbrunner and Zizek, 2006; Sherstobitova and Bylinkina, 1977; Yagi and Yoshida, 1977) ou à partir des données rapportées par les auteurs (Kresnowati et al., 2008b; Smith and Ho, 1985). La comparaison de ces études montre que les coefficients de transfert volumique pour le CO_2 en conditions de culture microbiennes sont inférieurs aux coefficients théoriques prédits par l'Equation 55 (Tableau 11). Aucune explication mécanistique n'est cependant proposée par les auteurs qui font ce constat (Hiltbrunner and Zizek, 2006; Sherstobitova and Bylinkina, 1977; Yagi and Yoshida, 1977).

La concentration en CO_2 dissous rapportée en culture continue en régime permanent par (Kresnowati et al., 2008b) est de 0.197 mM ce qui est presque trois fois inférieur à la concentration de 0.568 mM calculée en supposant l'équilibre thermodynamique avec la phase gaz. Il est donc probable que le capteur utilisé ait dérivé durant le temps de culture nécessaire à la stabilisation en régime permanent de cette culture continue à faible taux de dilution.

Le formalisme du potentiel de transfert $(x - x^*)$ et son impact sur la détermination de $K_L a \text{ CO}_2$ a été discuté par (Yagi and Yoshida, 1977). En effet la concentration x^* en équilibre avec la phase gaz évolue au cours de l'ascension d'une bulle dans le fermenteur. Négliger le transfert de CO_2 , c'est-à-dire supposer que la concentration en CO_2 dans la phase gaz reste égale à la valeur initiale, entraîne une sous-estimation du $K_L a$ comme par exemple dans (Hill, 2006). A l'inverse, supposer que la phase gaz est homogène, c'est-à-dire supposer que la fraction molaire en CO_2 dans la phase gaz reste égale à la valeur finale, entraîne une surestimation du $K_L a$. Un modèle de dispersion axiale de la phase gaz de type piston permet de tenir compte de l'évolution du gradient de concentration liquide / gaz du CO_2 au cours de l'ascension d'une bulle dans le fermenteur. Il a été montré que le $K_L a \text{ CO}_2$ calculé avec une cette hypothèse à partir de la mesure du flux transféré serait inférieure à la valeur théorique calculée en considérant l'Equation 55 et le $K_L a \text{ O}_2$ obtenu dans les mêmes conditions (Yagi and Yoshida, 1977). Les auteurs conseillent donc de négliger le transfert du CO_2 lors du calcul du gradient de concentration. Il est cependant improbable que cette approximation puisse être étendue au cas des cultures microbiennes intensives où les différences de concentration en CO_2 dans la phase gaz entre l'entrée et la sortie du fermenteur peuvent être importantes.

L'influence des paramètres physico-chimiques et rhéologiques de la dispersion gaz / liquide sur le transfert liquide / gaz du CO_2 est rarement considéré. Il a été signalé que le ratio entre les

coefficients de transfert volumiques du CO_2 et de l' O_2 dépendait de la viscosité du moût (Dahod, 1993). Pour des moûts faiblement visqueux le $K_L a \text{ CO}_2$ serait inférieur au $K_L a \text{ CO}_2$ théorique calculé à partir de l'Equation 55 et du $K_L a \text{ O}_2$. En revanche pour des moûts fortement visqueux le ratio entre le $K_L a \text{ CO}_2$ et le $K_L a \text{ O}_2$ augmente et se rapproche de celui prédit par l'Equation 55. Les travaux rapportés dans la littérature montrent que le coefficient volumique de transfert du CO_2 en conditions de culture microbienne peut être inférieur à celui prédit par une approche théorique basée sur l'Equation 55. Il faut cependant relever le manque de données quantitatives sur la désorption du CO_2 en conditions de culture microbienne et le manque d'explications mécanistiques sur les phénomènes observés.

Tableau 11. Comparaison des études rapportant une caractérisation de $K_L a(\text{CO}_2)$ en culture microbienne.

Conditions	$K_L a$	Reference
STR V = 1.5 L Culture batch de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> [X] _{max} = 7.5 g _{DW} ·L ⁻¹ e = 3341 W·m ⁻³ ^a et Us = 2.66 × 10 ⁻³ m·s ⁻¹ ^b	$K_L a(\text{CO}_2) \approx 200 \text{ h}^{-1 \text{ b}}$ $K_L a(\text{O}_2) \approx 395 - 674 \text{ h}^{-1 \text{ b}}$	(Yagi and Yoshida, 1977)
STR V = 14 L Culture batch de <i>Penicillium chrysogenum</i> [X] non défini e = 21138 W·m ⁻³ ^a et Us = 3.80 × 10 ⁻³ m·s ⁻¹ ^b	$K_L a(\text{CO}_2) \approx 76 \text{ h}^{-1 \text{ b}}$ $K_L a(\text{O}_2) \approx 2500 \text{ h}^{-1 \text{ c}}$	(Smith and Ho, 1985)
STR V = 2 L Culture batch de levure ou <i>Corynebacterium</i> Pas d'information sur e ou Us	$K_L a(\text{O}_2) < 100 \text{ h}^{-1}$ $K_L a(\text{CO}_2) / K_L a(\text{O}_2) = 0.2-0.7$	(Hiltbrunner and Zizek, 2006)
STR perfusion V = 10 L et V = 500 L Culture de cellule CHO [X] non défini e ≈ 1 W·m ⁻³ ^a	$K_L a(\text{CO}_2) = 0.17 \text{ h}^{-1}$ et 2.31 h^{-1} $K_L a(\text{O}_2) = 4.35 \text{ h}^{-1}$ et 3.91 h^{-1}	(Gray et al., 1996)
STR VL de 0.1 à 63 m ³ Culture non précisée	$K_L a(\text{CO}_2) / K_L a(\text{O}_2) = 0.05$	(Sherstobitova and Bylinkina, 1977)
STR V = 600 L Culture fed-batch de <i>Streptomyces</i> e ≈ 5000 W·m ⁻³ ^a et Us = 1.06 – 2.02 × 10 ⁻² m·s ⁻¹ ^b	$K_L(\text{CO}_2) / K_L(\text{O}_2) = 0.33$ pour des moûts faiblement visqueux (<100 cp). $K_L(\text{CO}_2) / K_L(\text{O}_2) = 0.6$ pour des moûts fortement visqueux (3000 cp).	(Dahod, 1993)

^a Estimé d'après la corrélation de (Hughmark, 1980)

^b Estimation

^c Estimé d'après la corrélation de Van't Riet en milieu non coalescent

1.3.7.4 Accélération du transfert interphasique du dioxyde de carbone

1.3.7.4.1 Accélération chimique

Les équilibres dynamiques du CO₂ avec l'acide carbonique et les ions hydrogénocarbonate dans la couche limite peuvent entraîner une production de CO₂ dans la couche limite et donc une accélération du transfert liquide / gaz de ce composé si le flux de production du CO₂ est significatif par rapport au flux de désorption (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977). Le bilan de matière du dioxyde de carbone dans la couche liquide en considérant les réactions d'équilibre avec les carbonates (Equation 13) est donné par l'Equation 57.

$$D_{CO_2} \frac{\delta x_{CO_2}^2}{\delta z^2} = -k_{+5} \times x_{CO_2} + k_{-5} \times x_{HCO_3^-} \times x_{H^+} \quad \text{Equation 57}$$

Le cas limite généralement considéré décrit i) une concentration constante en ions hydrogénocarbonates dans la couche limite égale à la concentration en équilibre avec la concentration en dioxyde de carbone dissous dans la phase liquide ii) une absence de catalyse enzymatique par l'anhydrase carbonique de la réaction de déshydratation du CO₂ (Yagi and Yoshida, 1977). Ce cas permet de maximiser la production de CO₂ par voie chimique dans la couche limite et donc l'effet de film (Royce and Thornhill, 1991). La solution de l'Equation 57 ne possède pas de dérivée et il est donc impossible de calculer de façon analytique l'accélération du transfert provoquée par la production de CO₂ dans la couche limite. Une approximation numérique a été proposée par (Yagi and Yoshida, 1977) dans des conditions de faible flux de transfert ($K_L a < 1 \text{ h}^{-1}$) et montre que l'accélération est de l'ordre de 1.13 % et est donc négligeable par rapport au flux physique. De même Royce et Thornhill calculent le flux maximal de production de CO₂ avec les mêmes hypothèses et montrent que le ratio de ce flux par rapport au flux de désorption peut être exprimé par l'Equation 58.

$$Acceleration = \frac{k_{+5} \times D_{CO_2}}{2 \times k_L^2} \quad \text{Equation 58}$$

La contribution de la production de CO₂ par voie chimique dans la couche limite est estimée pour une culture d'*E. coli* réalisée à 37°C soit pour une valeur du coefficient de diffusion de CO₂ de $2.01 \cdot 10^{-9} \text{ m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Wilke and Chang, 1955) et une valeur de k_L estimée à $7.8 \cdot 10^{-5} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ calculée pour une culture d'*E. coli* par (Fyferling, 2007). L'effet d'accélération produit par la réaction chimique est de 1.38 % et peut donc être négligée.

1.3.7.4.2 Accélération biologique

L'activité respiratoire de la biomasse dans la couche limite liquide produit du dioxyde de carbone et peut donc conduire à une augmentation du transfert liquide / gaz de ce composé. Le bilan de matière du dioxyde de carbone sur l'épaisseur de la couche limite est donné par l'Equation 59. De

la même façon que pour l'oxygène, il est possible de résoudre cette équation pour obtenir le profil de la concentration en dioxyde de carbone dissous en fonction de la côte z (Equation 60) et le facteur d'accélération E du transfert liquide / gaz (Equation 61) si la concentration en biomasse dans la couche limite liquide est supposée identique à celle dans le cœur de la phase liquide (Merchuck, 1977).

$$D_{CO_2} \frac{d^2 x_{CO_2}}{dz^2} = \frac{d^2 x_{CO_2}}{dt} + X \times q_{CO_2} \quad \text{Equation 59}$$

$$x_{CO_2} = \left(-\frac{X \times q_{CO_2}}{2 \times D_{CO_2}} \right) \cdot z^2 + \quad \text{Equation 60}$$

$$\left(\frac{-2 \times x_L \times D_{CO_2} + X \times q_{CO_2} \times \delta^2 + 2 \times x_{CO_2}^* \times D_{CO_2}}{2 \times \delta \times D_{CO_2}} \right) \times z + x_{CO_2}^* \\ E = \frac{D_{CO_2} \times X \times q_{CO_2}}{k_L^2 \times x_{CO_2}^*} \quad \text{Equation 61}$$

Dans le cas de cultures microbiennes aérobies intensives en métabolisme oxydatif les vitesses de production de dioxyde de carbone peuvent atteindre $0.7 \text{ mole.L}^{-1}.\text{h}^{-1}$ (calculé à partir des vitesses volumiques de consommation d'oxygène en supposant un quotient respiratoire égal à l'unité) (Fyferling et al., 2008; Knoll et al., 2007). Les profils de la concentration en dioxyde de carbone dissous sont néanmoins peu impactés par la production de CO_2 dans la couche limite du fait de l'activité respiratoire (Figure 11 et Figure 12). Au contraire les profils de concentration de l'oxygène dissous dans la couche limite deviennent nettement plus concaves en présence d'une réaction de consommation de ce composé dans la couche limite liquide (Fyferling, 2007). Cette différence est liée à la solubilité plus importante du dioxyde de carbone. L'accélération du transfert liquide / gaz du CO_2 par la production de CO_2 dans la couche limite est donc faible (Figure 13).

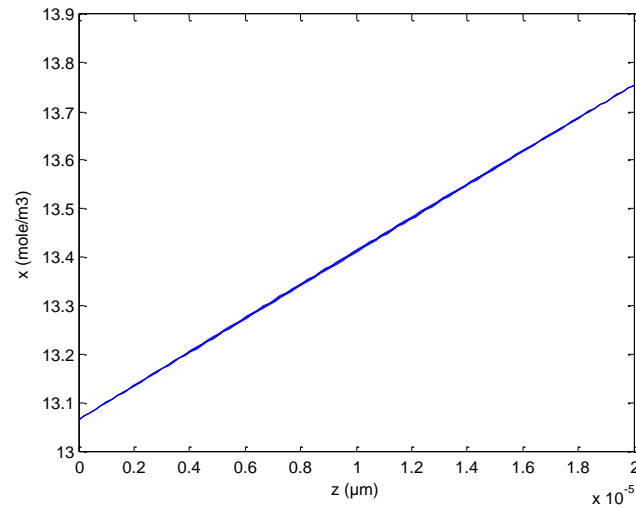


Figure 11. Evolution de la concentration en dioxyde de carbone dissous dans la couche limite liquide dans le cas d'une désorption avec production simultanée de CO_2 dans la couche limite. L'épaisseur de la couche limite a été fixée à $20\mu\text{m}$, la température à 30°C , la concentration dans la phase liquide est de 13.5 mM et la concentration dans la phase gaz est de 0.135 mM .

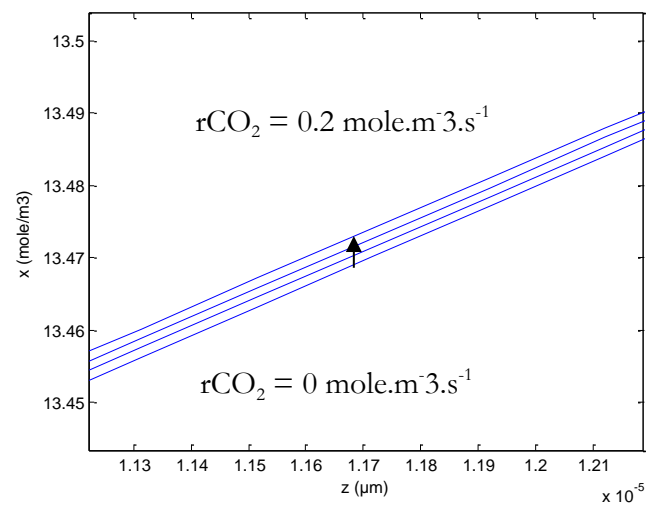


Figure 12. Détail permettant de mettre en évidence l'influence de la vitesse de production de CO_2 sur le profil de concentration dans la couche limite.

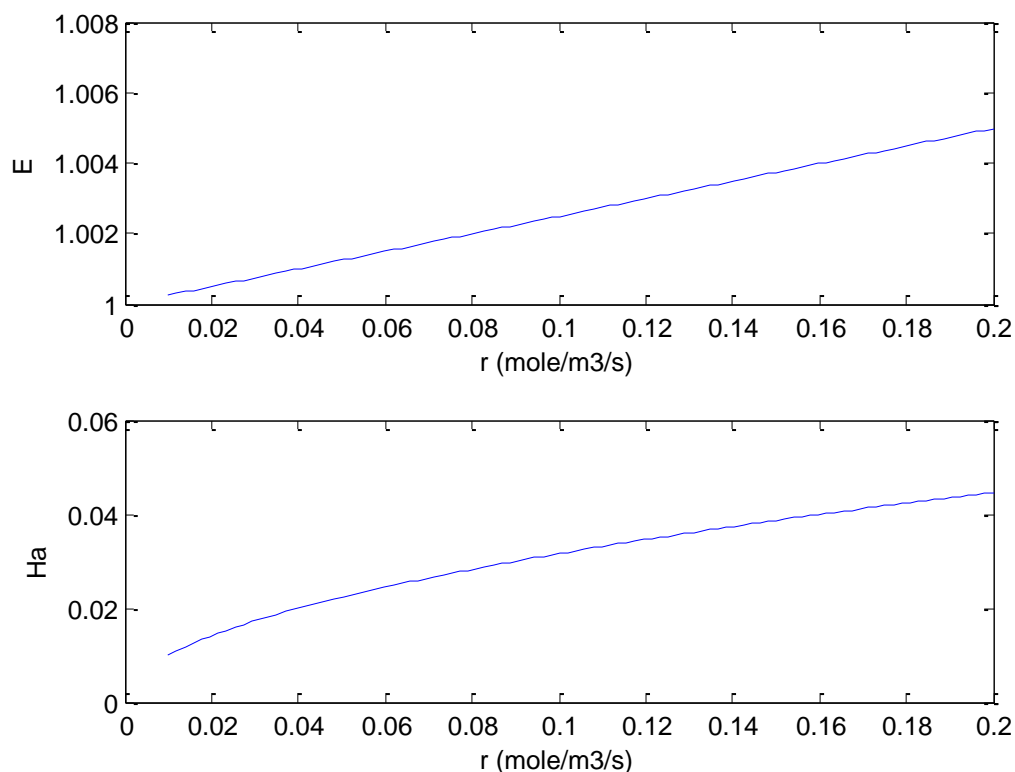


Figure 13. Evolution du facteur d'accélération E et du nombre de Hatta correspondant en fonction de la vitesse de production de CO₂ dans la couche limite liquide. L'épaisseur de la couche limite a été fixée à 20 μ m, la température à 30°C, la concentration dans la phase liquide est de 13.5 mM et la concentration dans la phase gaz est de 0.135 mM

1.4 Détermination du cadre de l'étude et de la problématique scientifique

L'étude bibliographique réalisée a permis de dresser un état des lieux des connaissances actuelles sur les mécanismes de désorption du dioxyde de carbone dissous des moûts de fermentation et sur l'impact de ce composé sur le métabolisme de la levure *S. cerevisiae*. Une brève présentation du métabolisme de ce micro-organisme modèle a également été proposée, notamment sur le déclenchement de l'effet Crabtree.

Le transfert liquide / gaz du dioxyde de carbone est classiquement décrit par analogie avec le transfert gaz / liquide de l'oxygène avec une correction pour les diffusivités différentes de ces deux composés (Royce and Thornhill, 1991). Le transfert liquide / gaz par nucléation séparée de microbulles de CO₂ peut être négligée dans des conditions de culture microbienne aérobie mais il est nécessaire de considérer les équilibres dynamiques existant en phase liquide entre les différentes espèces constituant le carbone inorganique total. Le coefficient volumétrique de transfert caractérisant la dynamique du flux d'absorption de l'oxygène dépend de la puissance dissipée, de l'aire interfaciale de la phase gaz dispersée dans la phase liquide, des paramètres physico-chimiques (force ionique, tension de surface) et rhéologiques (viscosité) de la phase liquide et de la présence d'une réaction de consommation d'oxygène dans la phase liquide. Les

études empiriques sur le transfert gaz / liquide de l'oxygène ont cependant été réalisées dans des milieux modèles coalescents ou non-coalescents pour des puissances dissipées faibles ($< 8 \text{ kW.m}^{-3}$). Elles ne sont donc pas compatibles avec des conditions de culture intensive où les niveaux de puissance dissipée sont beaucoup plus élevés afin d'assurer un transfert d'oxygène suffisant à la réaction biologique de consommation d'oxygène (Fyferling et al., 2008; Knoll et al., 2007; Schaepe et al., 2013). De la même façon les études sur la désorption du CO_2 en réacteur agité aéré ont le plus souvent été réalisées en milieux modèles, en l'absence d'une réaction de production du CO_2 et pour des puissances dissipées et des débits de ventilation faibles amenant à des coefficients volumiques de transfert très inférieurs à ceux atteints pour l'oxygène lors de cultures microbiennes intensives (Gray et al., 1996; Hill, 2006; Kordač and Linek, 2008; Matsunaga et al., 2009b; Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011). Elles permettent néanmoins de mettre en évidence que le coefficient volumétrique de transfert du dioxyde de carbone en réacteur agité aéré serait principalement dépendant du débit de ventilation et non de la puissance dissipée comme pour l'oxygène (Gray et al., 1996; Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011). Ce phénomène serait lié à la nature de la dispersion de la phase gaz dans la phase liquide en réacteur agité aéré (Sieblist et al., 2011). De la même façon en conditions de culture microbienne plusieurs auteurs mentionnent des coefficients volumétriques de transfert liquide / gaz du CO_2 inférieurs aux coefficients théoriques calculés à partir des coefficients volumétriques de transfert gaz / liquide de l'oxygène (Dahod, 1993; Hiltbrunner and Zizek, 2006; Sherstobitova and Bylinkina, 1977; Smith and Ho, 1985). La validité de l'analogie faite entre transfert liquide / gaz du dioxyde de carbone et transfert gaz / liquide de l'oxygène est donc remise en question. Une désorption lente du CO_2 des moûts de fermentation pourrait entraîner une accumulation du CO_2 en phase liquide et donc un impact sur la physiologie du micro-organisme cultivé. Le micro-organisme *S. cerevisiae* est considéré comme modèle dans ce travail.

L'impact du CO_2 sur la physiologie de la levure *S. cerevisiae* a fait l'objet de nombreux travaux en métabolisme anaérobie, oxydo-fermentaire et oxydatif. L'analyse comparative de ces publications est difficile en raison de l'hétérogénéité importante dans les conditions de culture (nature des substrats, conduite de fermentation) et de l'absence fréquente de quantification des concentrations en CO_2 dissous. Il apparaît toutefois que des concentrations élevées en CO_2 dissous peuvent impacter de façon significative la physiologie de la levure. Cet impact est plus marqué en métabolisme oxydatif et est caractérisé par une baisse du rendement en biomasse formée par rapport au glucose consommé et une augmentation des vitesses spécifiques de respiration (Aguilera et al., 2005b; Chen et al., 1976). Il a également été montré récemment qu'un incrément de la concentration en CO_2 dissous pouvait causer une réponse transitoire de la levure

(Aboka et al., 2012; Krook et al., 2004). Les études de type physiologie quantitative concernant l'impact du CO₂ sur la levure sont cependant rares (Aboka et al., 2012; Aguilera et al., 2005b; Chen et al., 1976; Krook et al., 2004; Renger, 1991) et les mécanismes d'action du CO₂ sont encore mal connus.

La maîtrise de la bascule métabolique du métabolisme oxydatif au métabolisme oxydo-fermentaire est un enjeu crucial pour les industries de production utilisant la levure en métabolisme oxydatif. La transition du métabolisme oxydatif au métabolisme oxydo-fermentaire chez *S. cerevisiae* a fait l'objet de nombreux travaux dans la littérature mais les mécanismes à l'origine de cette transition n'ont pas été identifiés à ce jour. L'hypothèse généralement acceptée est l'existence d'une capacité respiratoire limite entraînant un phénomène d'overflow métabolique. Le dioxyde de carbone est impliqué en tant que produit ou substrat dans de nombreuses réactions du métabolisme de la levure *S. cerevisiae* mais son rôle dans la transition respiro-fermentaire n'a pas fait l'objet d'investigations jusqu'à présent.

Le dioxyde de carbone est un produit du métabolisme cellulaire impliqué dans des phénomènes de transfert (biomasse / liquide et liquide / gaz) à l'échelle du réacteur. La concentration en dioxyde de carbone dissous dans la phase liquide dépend de la dynamique de ces phénomènes de transfert, des équilibres dynamiques avec les espèces du système carbone inorganique total et de la production de CO₂ par le métabolisme cellulaire. Des concentrations élevées en CO₂ dissous peuvent impacter la physiologie des micro-organismes, notamment pour la levure modèle *S. cerevisiae*. Les phénomènes de transfert interphasiques du CO₂ et l'impact réel du CO₂ sur la physiologie des micro-organismes sont encore mal connus laissant ouvert le champ pour nos investigations. A ce titre les questions scientifiques de ce travail de thèse sont :

Comment décrire le transfert liquide / gaz du dioxyde de carbone en conditions de culture microbienne intensive ? L'approche théorique décrite dans la littérature peut-elle être appliquée pour des cultures à haute densité cellulaire c'est-à-dire avec de forts flux de production de CO₂, l'application de puissances dissipées élevées dans des réacteurs multi-turbines, un flux d'absorption croisé gaz / liquide de l'oxygène important et un milieu complexe évolutif et partiellement non-coalescent ? La mesure de la fraction molaire en dioxyde de carbone dans les gaz de sortie et la caractérisation des performances de transfert gaz / liquide de l'oxygène sont-elles suffisantes pour évaluer la concentration en dioxyde de carbone dissous lors d'une culture microbienne intensive ?

Quel est l'impact de la concentration en dioxyde de carbone dissous sur le métabolisme oxydatif de la levure *S. cerevisiae* ? L'impact du CO₂ dissous sur la physiologie de la levure a fait l'objet de peu de travaux de physiologie quantitative et semble sous-estimé dans la littérature.

Quel est l'impact du dioxyde de carbone sur la transition respiro-fermentaire chez la levure *S. cerevisiae* ? Le dioxyde de carbone est un produit ou substrat de nombreuses voies métaboliques impliquées dans la capacité respiratoire sous sa forme dissoute ou par des formes ioniques résultant d'équilibres chimiques avec les ions hydrogénocarbonates. Le dioxyde de carbone apparaît donc comme un effecteur global pouvant impacter le déclenchement de l'effet Crabtree.

Les expérimentations réalisées dans le but de formuler des éléments de réponse à ces questions ont été mises en œuvre dans l'environnement contrôlé et maîtrisé de bioréacteurs. Une conduite discontinue alimentée (fed-batch) a été adoptée pour l'étude du transfert liquide / gaz du CO₂ dans la mesure où elle permet de mimer les conditions de mise en œuvre industrielle des micro-organismes. Une conduite continue (chemostat) ou accélérée (accélérostat) a été adoptée pour l'étude de l'impact de la concentration en CO₂ dissous sur la physiologie du micro-organisme modèle *S. cerevisiae* afin de permettre une étude plus fine des réponses de la levure à des incréments de CO₂ dissous.

2. Matériel et méthodes

2.1 Souche et milieux de culture

2.1.1 Souche utilisée

La souche de *S. cerevisiae* utilisée est CEN.PK 113-7D. Cette souche est une souche haploïde prototrophe dérivée de la souche CEN.PK 122 choisie comme souche de référence pour l'étude de la physiologie et du métabolisme de la levure *S. cerevisiae* (van Dijken et al., 2000).

2.1.2 Milieux de culture

2.1.2.1 Milieux riches

La composition du milieu riche YEPD pour les cultures liquides est définie dans le Tableau 12. Pour les cultures en boîte de Pétri de l'agar est ajouté dans le milieu.

Tableau 12. Composition du milieu riche YEPD.

Composé	Concentration finale (g.L ⁻¹)
Extrait de levure	10
Bacto-peptone	20
D-glucose	20
Agar (si culture sur milieu solide)	15

2.1.2.2 Milieux synthétiques

2.1.2.2.1 Culture discontinue alimentée

2.1.2.2.1.1 Milieu salin initial

La composition du milieu salin initial de la culture discontinue alimentée est présentée dans le Tableau 13. Ce milieu est préparé en utilisant de l'eau du réseau, est ajusté à pH 5.0 avec de l'acide ortho phosphorique 85% (w/w) et stérilisé par autoclavage (20 min, 121°C).

Tableau 13. Composition du milieu salin initial (culture discontinue alimentée).

Composé	Concentration milieu salin initial (g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.6
KH ₂ PO ₄	4.8
(NH ₄) ₂ HPO ₄	3.2
MgSO ₄ , 7H ₂ O	2.97
Glutamate de sodium	1.1
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	0.0377
MnSO ₄ , H ₂ O	0.00156
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.0481
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.00672
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	0.0064
CaCl ₂ , 2H ₂ O	0.0481
H ₃ BO ₃	0.0004

Tableau 14. Composition de la solution de fer pour le milieu salin initial (culture discontinue alimentée).

Composé	Concentration solution stock (g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ Fe(SO ₄) ₆ ·H ₂ O	0.0694

2.1.2.2.1.2 Milieu salin d'alimentation

La composition du milieu salin d'alimentation de la culture discontinue alimentée est présentée dans le Tableau 15. Ce milieu est préparé en utilisant de l'eau du réseau et stérilisé par autoclavage (20 min, 121°C).

Tableau 15. Composition du milieu salin d'alimentation (culture discontinue alimentée).

Composé	Concentration milieu salin initial (g.L ⁻¹)
MgSO ₄ ·7H ₂ O	36
CoCl ₂ ·6H ₂ O	1.49
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.143
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.301
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5
H ₃ BO ₃	0.035
MnSO ₄ ·H ₂ O	0.103
NaCl	10
KCl	55.83
H ₃ PO ₄	90.733
H ₂ SO ₄	212.565

Afin d'éviter tout risque de précipitation du milieu salin d'alimentation les solutions de fer et de calcium sont préparées séparément à un facteur de concentration de 200X et de 50X respectivement (Tableau 16 et Tableau 17). Le pH de la solution de fer est ajusté à 1.0 par ajout de HCl 37% (w/w) et les deux solutions sont stérilisées par autoclavage (20 min, 121°C).

Tableau 16. Composition de la solution de fer 200X pour le milieu salin d'alimentation (culture discontinue alimentée).

Composé	Concentration solution stock (g.L ⁻¹)
Fe(SO ₄) ₂ ·7H ₂ O	200

Tableau 17. Composition de la solution de calcium 50X pour le milieu salin d'alimentation (culture discontinue alimentée).

Composé	Concentration solution stock (g.L ⁻¹)
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.6

2.1.2.2.1.3 Solution de vitamines

La solution de vitamines est préparée en utilisant de l'eau ultra pure et avec un facteur de concentration de 1000X. La biotine est dissoute dans 50 mL d'une solution de NaOH à 0.1 M et 750 mL d'eau sont ensuite ajoutés. Les différentes vitamines sont ajoutées dans l'ordre indiqué

dans le Tableau 18 et le pH est maintenu à 6.5 après chaque ajout par utilisation d'HCl 1 N. La solution est stérilisée par filtration (filtres stériles Minisart® 0.22 µm, Sartorius) dans un flacon pénicilline stérilisé au préalable par autoclavage (20 min, 121°C).

Un apport en vitamines doit théoriquement être réalisé tous les 20 g_{dw}.L⁻¹ formés. Afin de s'affranchir de cette contrainte le volume de solution stock de vitamines nécessaire à la formation de la quantité maximale de biomasse obtenue à partir de la solution de glucose préparée est mélangé à la solution de la source carbonée. Un apport continu de vitamines est donc réalisé au cours de la culture.

Tableau 18. Composition de la solution de vitamines 1000X (culture discontinue alimentée).

Composé	Concentration milieu salin initial (g.L ⁻¹)
D-biotine	0.05
Pantothénate	1
Acide nicotinique	1
Myo inositol	25
Thiamine hydrochloride	1
Pyridoxol hydrochloride	1
Acide para amino benzoïque	0.2

2.1.2.2.2 Culture continue

2.1.2.2.2.1 Définition du milieu de culture

Le milieu synthétique utilisé est dérivée du milieu défini par Verduyn (Verduyn et al., 1992). Le milieu initial a été optimisé pour obtenir 10 g_{DW}.L⁻¹ (Visser et al., 2002). Les concentrations en sels et oligo-éléments ont donc été doublées (à part Na₂MoO₄, 2H₂O) et les concentrations finales en vitamines ont été quadruplées (à part la biotine) de façon à pouvoir soutenir une concentration finale de 20 g_{DW}.L⁻¹ environ. De plus, l'éthanol est ajouté au milieu de culture afin d'éviter la présence d'oscillations métaboliques. Le rapport éthanol / glucose choisi pour les sources carbonées est de 0.066 Cmole_{éthanol} · Cmoles_{glucose}⁻¹ (Kresnowati et al., 2007; Mashego, 2005b; Visser et al., 2002). De l'ampicilline est ajouté au milieu afin d'éviter les contaminations bactériennes (Féria-Gervasio, 2008; Mouret, 2006). La composition du milieu synthétique utilisé est définie dans le Tableau 19.

Tableau 19. Composition du milieu synthétique utilisé pour les cultures continues.

Nature	Composé	Concentration Verduyn (g.L ⁻¹)	Concentration finale utilisée (g.L ⁻¹)
Sources de carbone	Glucose	10.000	40.000
	Ethanol	0.000	2.100
Milieu salin	(NH ₄) ₂ SO ₄	5.000	12.000
	KH ₂ PO ₄	3.000	6.000
	MgSO ₄ , 7H ₂ O	0.500	2.047

Nature	Composé	Concentration Verduyn (g.L ⁻¹)	finale	Concentration utilisée (g.L ⁻¹)	finale
Oligo-éléments	Na ₂ EDTA	1.500 x10 ⁻²		3.333 x 10 ⁻²	
	ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4.500 x10 ⁻³		8.964 x 10 ⁻³	
	MnCl ₂ , 4H ₂ O	1.000 x10 ⁻³		1.992 x 10 ⁻³	
	CoCl ₂ , 6H ₂ O	3.00 x10 ⁻⁴		5.976 x 10 ⁻⁴	
	CuSO ₄ , 5H ₂ O	3.00 x10 ⁻⁴		5.976 x 10 ⁻⁴	
	Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	4.00 x10 ⁻⁴		7.968 x10 ⁻³	
	CaCl ₂ , 2H ₂ O	4.500 x10 ⁻³		8.964 x10 ⁻³	
	FeSO ₄ , 7H ₂ O	3.000 x10 ⁻³		5.976 x 10 ⁻³	
	H ₃ BO ₃	1.000 x10 ⁻³		1.992 x10 ⁻³	
	KI	1.00 x10 ⁻⁴		0.000	
Vitamines	D-biotine	0.050 x 10 ⁻³		3.984 x10 ⁻³	
	D-L acide pantothénique	1.000 x10 ⁻³		3.984 x10 ⁻³	
	Acide nicotinique	1.000 x10 ⁻³		3.984 x10 ⁻³	
	Myo-inositol	25.000 x10 ⁻³		50.000 x10 ⁻³	
	Thiamine hydrochloride	1.000 x10 ⁻³		3.984 x10 ⁻³	
	Pyridoxine hydrochloride	1.000 x10 ⁻³		3.984 x10 ⁻³	
	Acide para-amino benzoïque	0.200 x10 ⁻³		0.796 x10 ⁻³	
	Sel de Sodium Ampicilline	0.000		0.050	

2.1.2.2.2.2 Assemblage des milieux

2.1.2.2.2.2.1 Composition des solutions stocks

Une solution de glucose à 500 g_{glucose}. L⁻¹ est préparé à partir de cérélose (glucose mono hydraté) en utilisant de l'eau osmosée et stérilisée par autoclavage (20 min, 121°C).

L'éthanol utilisé est de l'éthanol absolu stérilisé par filtration (filtres PFTE 0.22 µm, Sartorius) dans un flacon préalablement stérilisée par autoclavage (20 min, 121°C).

Le milieu salin de base est préparé en utilisant de l'eau du réseau, ajusté à 5.0 et stérilisé par autoclavage (20 min, 121°C). Les concentrations de la solution stock sont recalculées pour tenir compte de l'apport de l'inoculum, de la solution de glucose et des solutions d'oligo-éléments, de vitamines et d'antibiotique (Tableau 20). La densité du milieu salin stock à 20°C est de 1.01065 ± 0.0001 g.cm⁻³.

Les oligo-éléments peuvent être préparés ensemble dans un mix ou séparément. Dans le premier cas les oligo-éléments sont dissous dans de l'eau ultra-pure dans l'ordre et aux concentrations indiqués dans le Tableau 21. La solution stock est ensuite stérilisée par filtration (filtres stériles Minisart® 0.22 µm, Sartorius) dans un flacon pénicilline stérilisé au préalable par autoclavage (20

min, 121°C). Dans le second cas une solution stock est réalisée pour chaque élément en utilisant de l'eau ultra-pure (

Tableau 22) et stérilisée par filtration (filtres stériles Minisart® 0.22 µm, Sartorius) dans des flacons pénicilline stérilisés au préalable par autoclavage (20 min, 121°C). La solution de fer est ajustée à pH 1 avec de l'acide chlorhydrique 37%.

Une solution stock de vitamines est préparée en utilisant de l'eau ultra-pure (Tableau 23), ajustée à pH 6.50 et stérilisée par filtration (filtres stériles Minisart® 0.22 µm, Sartorius) dans un flacon pénicilline stérilisé au préalable par autoclavage (20 min, 121°C).

Une solution stock d'antibiotique est préparée en utilisant de l'eau ultra-pure (Tableau 24) et stérilisée par filtration (filtres stériles Minisart® 0.22 µm, Sartorius) dans un flacon pénicilline stérilisé au préalable par autoclavage (20 min, 121°C).

Tableau 20. Composition de la solution saline stock (culture continue).

Composé	Concentration solution stock (g.L ⁻¹)
(NH ₄) ₂ SO ₄	13.250
KH ₂ PO ₄	6.627
MgSO ₄ , 7H ₂ O	2.261

Tableau 21. Composition de la solution stock d'oligo-éléments 500 X (culture continue).

Composé	Concentration solution stock (g.L ⁻¹)
Na ₂ EDTA	15
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	4.5
MnCl ₂ , 4H ₂ O	1
CoCl ₂ , 6H ₂ O	0.3
CuSO ₄ , 5H ₂ O	0.3
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	3
CaCl ₂ , 2H ₂ O	4.5
FeSO ₄ , 7H ₂ O	3
H ₃ BO ₃	1

Tableau 22. Composition des solutions stocks individuelles d'oligo-éléments (culture continue).

Composé	Concentration stock (g.L ⁻¹)	Facteur de concentration (X)
Na ₂ EDTA	29.820	900
ZnSO ₄ , 7H ₂ O	8.986	1000
MnCl ₂ , 4H ₂ O	2.011	1000
CoCl ₂ , 6H ₂ O	6.330 x 10 ⁻¹	1000
CuSO ₄ , 5H ₂ O	6.360 x 10 ⁻¹	1000
Na ₂ MoO ₄ , 2H ₂ O	7.968	1000
CaCl ₂ , 2H ₂ O	8.964	1000

FeSO ₄ , 7H ₂ O	11.196	2000
H ₃ BO ₃	1.996	1000

Tableau 23. Composition de la solution stock de vitamines 250 X (culture continue).

Composé	Concentration solution stock (g.L ⁻¹)
D-biotine	1.000
D-L acide pantothénique	1.000
Acide nicotinique	1.000
Myo-inositol	25.000
Thiamine	1.000
Pyridoxine hydrochloride	1.000
Acide para-amino benzoïque	0.2

Tableau 24. Composition de la solution stock d'antibiotique 450 X (culture continue).

Composé	Concentration stock (g.L ⁻¹)	Facteur de concentration (X)
Sel de sodium ampicilline	22.5	450

2.1.2.2.2.2 Milieu initial

Le volume du milieu initial est de 1.8 L. Le réacteur est stérilisé par autoclavage avec un volume initial $V = 2.0$ L d'eau osmosée. Après mise en place du réacteur l'eau est intégralement vidangée via la pompe de sortie et le milieu initial est assemblé *in situ* dans le réacteur. Ce protocole permet de limiter les erreurs sur la valeur du volume initial dues à l'évaporation lors de l'autoclavage.

Tableau 25. Assemblage du milieu initial pour un volume final de 1.8 L (culture continue).

Solution stock	Milieu salin	Glucose	Vitamines	Oligo-éléments	Antibiotique
Volume nécessaire (mL)	1640.8	14	7.2	4.0	4.0

La concentration de la solution stock de glucose (voisine de $500 \text{ g}_{\text{glucose}} \cdot \text{L}^{-1}$) est déterminée à partir de la mesure de la densité de cette solution à 20°C après autoclavage. Le volume de solution de glucose à apporter est alors recalculé à partir de la connaissance de la concentration exacte de la solution stock de glucose.

2.1.2.2.2.3 Milieu d'alimentation

Le volume du milieu d'alimentation contenu dans un bidon Norprène est de 45.0 L. Le bidon est équipé d'une boucle externe et la circulation du milieu dans cette boucle est assurée par une pompe externe. La recirculation active durant la culture garantit l'homogénéité du milieu d'alimentation avec un taux de renouvellement de 1 h^{-1} .

Le bidon est rempli avec un volume de milieu salin stock de 40.92 L et stérilisé par autoclavage (121°C, 5h). L'évaporation d'eau liée au processus de stérilisation est estimée par pesée du bidon avant et après autoclavage.

Après refroidissement du bidon le milieu d'alimentation est complété (Tableau 26). En pratique le volume de la solution stock de glucose est recalculé afin de tenir compte de l'évaporation d'eau durant l'autoclavage du milieu salin stock et de la solution stock de glucose. Le milieu d'alimentation complet est homogénéisé par recirculation dans la boucle externe. Un critère de 10 recirculations du volume du bidon est défini arbitrairement comme garantissant l'homogénéité du bidon. La densité à 20°C du milieu d'alimentation complet est de 1.015 g.cm⁻³.

Tableau 26. Assemblage du milieu d'alimentation pour un volume final de 45.0 L (culture continue).

Solution stock		Milieu salin	Glucose	Vitamines	Oligo-éléments	Antibiotique
Volume	nécessaire	409200	3600	179	89	100
(mL)						

2.2 Mise en œuvre des cultures

2.2.1 Conservation des souches

Une banque cellulaire est réalisée au début du projet afin de disposer d'un stock d'aliqots homogènes pour l'initiation des cultures.

Un étalement en boîte de Pétri est réalisé à partir d'un cryo-tube sur milieu YPD + agar (Tableau 12) afin de vérifier le caractère mono-axénique de la souche. Une culture sur milieu YPD (section) en fiole d'Erlenmeyer est réalisée à 30°C et sous agitation orbitale de 150 rpm à partir d'une colonie isolée. Cette culture est arrêtée en phase exponentielle de croissance et du glycérol est ajouté au moût comme cryo-préservant (20 % w/w). Des aliqots de 1 mL sont réalisés dans des cryo-tubes et conservés à -80°C pour un usage ultérieur.

2.2.2 Chaîne de propagation

2.2.2.1 Culture discontinue alimentée

Une culture sur boîte de Pétri est réalisée à 30°C durant 30h à partir d'un cryo-tube en utilisant le milieu YEPD solide (Tableau 12).

Trois prés-cultures en tube droit sont réalisées à partir d'une colonie isolée durant 12h à 30°C avec une agitation orbitale de 150 rpm en utilisant 5 mL du milieu YEPD liquide (Tableau 12).

Trois pré-cultures en fiole d'Erlenmeyer bafflées sont réalisées à partir des pré-cultures en tubes droits (taux d'inoculation 10% v / v) durant 12h à 30°C et avec une agitation orbitale de 150 rpm en utilisant 50 mL du milieu synthétique complet (Tableau 13) complétée avec 20 g.L⁻¹ de glucose, la solution de fer 400X et la solution de vitamines 500X.

Trois pré-cultures en fiole d'Erlenmeyer bafflées sont réalisées à partir des pré-cultures précédentes (taux d'inoculation 10% v /v) durant 12h à 30°C et avec une agitation orbitale de 150 rpm en utilisant 50 mL du milieu synthétique complet (Tableau 13) complétée avec 20 g.L⁻¹ de glucose, la solution de fer 400X et la solution de vitamines 500X.

Deux des pré-cultures sont utilisées pour inoculer le réacteur à un taux d'inoculation de 10 % (v/v).

2.2.2.2 Culture continue

Une culture sur boîte de Pétri est réalisée à 30°C durant 30h à partir d'un cryo-tube en utilisant le milieu YEPD solide (Tableau 12).

Des prés-cultures en tube droit sont réalisées à partir d'une colonie isolée durant 12h à 30°C avec une agitation orbitale de 150 rpm en utilisant 5 mL du milieu YEPD liquide (Tableau 12).

Une pré-culture en fiole d'Erlenmeyer bafflée est réalisée à partir de deux pré-culture en tubes droits (taux d'inoculation 10% v /v) durant 12h à 30°C et avec une agitation orbitale de 150 rpm en utilisant 190 mL du milieu synthétique complet (Tableau 19). Cette pré-culture est utilisée pour inoculer le réacteur à un taux d'inoculation de 10 % (v/v).

2.2.3 Cultures en fermenteurs

2.2.3.1 Culture discontinue alimentée

2.2.3.1.1 Description du dispositif expérimental

La culture discontinue alimentée est réalisée dans un fermenteur Biostat E de type ES15B et de volume total 23 L (Braun Biotech International, Allemagne). Le dispositif expérimental est représenté sur la Figure 14. Le réacteur est équipé d'une double enveloppe pour la régulation température et d'un fond concave. Le diamètre interne du réacteur est de 0.21 m et la hauteur de 0.63 m. Le réacteur est équipé de 4 contre-baffles de 0.46 m de hauteur et d'un sparger de type O-ring placé au fond. Trois turbines Rushton 6 pales (diamètre externe 0.084 m, hauteur des pales 17 mm) placées à 5.5, 18 et 30 cm du fond du réacteur sont placées sur l'arbre d'agitation dont la rotation est assurée par un moteur de 746 W. Un débitmètre massique est utilisé pour le contrôle du débit de ventilation (model 5850 TR, Brooks, USA). L'air est filtré en amont du fermenteur par utilisation d'un filtre 0.2 µm (Modèle Sartobran, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Allemagne).

Les différents modules analogiques du contrôleur Biostat E permettent une régulation PID pour la vitesse d'agitation, de la température, de la pression relative et du pH. Un logiciel développé au laboratoire par Jean-Louis Uribe Larrea est utilisé pour l'acquisition en ligne de ces paramètres et

de la pression partielle en oxygène dissous, pour contrôler les débits d'alimentation (glucose, milieu salin) et pour calculer les variables d'état (RQ, vitesses de respiration, volume de liquide). Les données sont enregistrées toutes les 45 s.

Le pH est mesuré par une sonde Fermprobe de 11.3 cm de long (Broadley and James, USA). La pression partielle en oxygène dissous est mesurée par une sonde D435 Oxyprobe de 8.4 cm de long (Broadley and James, USA). Les deux sondes sont situées au niveau de piquages latéraux situés 10 cm au dessus du fond de la cuve à 15°C par rapport à l'horizontale

La température est réglée à 30°C et le pH est réglé à 5.0 par l'addition d'une solution d'ammoniaque à 8.20 N. La pression relative est fixée à 0.3 bars. Le réacteur est équipé d'une sonde anti-mousse (Sartorius, Germany) and des ajouts ponctuels d'agent antimousse Struktol JG73 (Schill-Seilacher, Germany) sont réalisés au cours de la culture : la concentration maximale en antimousse atteinte est de 24.70 ppm.

L'apport de la solution de glucose (concentration 680.47 g.L⁻¹) est réalisé par une pompe péristaltique B-Braun FE411. L'apport du milieu salin est réalisé par une pompe péristaltique Gilson Minipuls 3 (Gibson, France). L'apport de l'agent antimousse et de l'ammoniaque 14% est réalisé par les pompes péristaltiques du contrôleur C-DCU. Les masses des bouteilles sont mesurées en continu pour le glucose (balance IB16000S, Sartorius, Allemagne) et le milieu salin (balance CP2202S, Sartorius, Allemagne). La masse de la bouteille d'ammoniaque est mesurée régulièrement en utilisant une balance CP2202S (Sartorius, Allemagne).

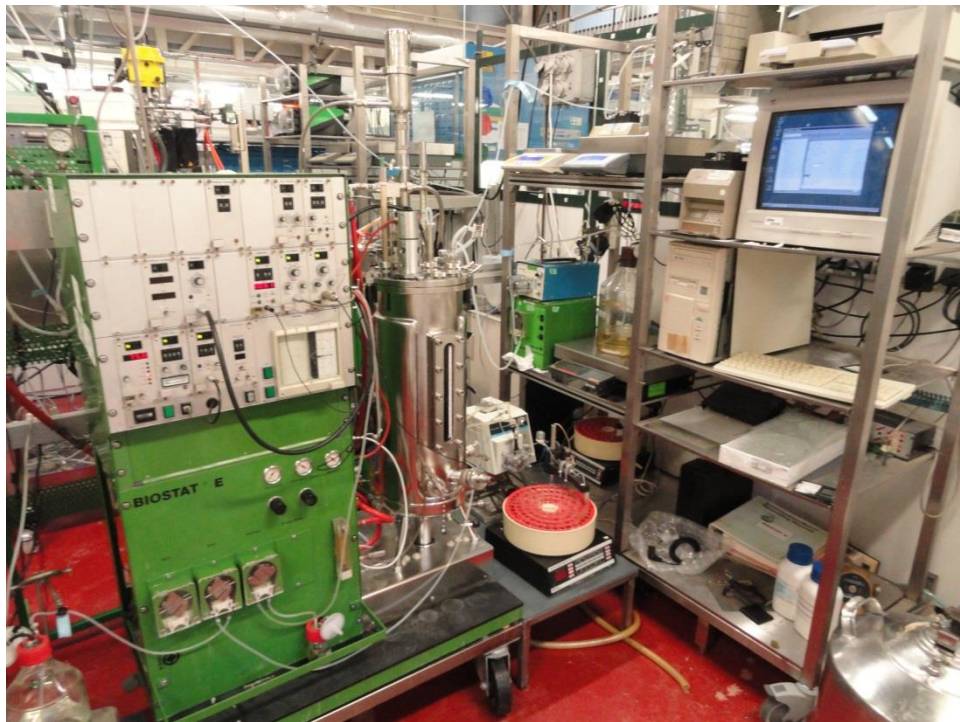


Figure 14. Photographie du dispositif expérimental pour la culture discontinue alimentée.

2.2.3.1.2 Conduite de culture

Les cultures de type discontinue alimentées sont réalisées avec une conduite de type alimentation exponentielle ce qui permet de maintenir un taux de croissance constant et une concentration limitante de substrat carboné afin de maintenir un métabolisme purement oxydatif de la levure *S.cerevisiae*.

Le bilan de conservation de la matière pour la biomasse dans le réacteur est présenté dans l'Equation 62.

$$\frac{d(X.V_L)}{dt} = r_X.V_L \quad \text{Equation 62}$$

La solution de l'Equation 62 si le taux de croissance μ est constant est présentée dans l'Equation 63.

$$X(t).V_L(t) = X_0.V_{L,0} \cdot \exp^{\mu.t} \quad \text{Equation 63}$$

Le bilan de conservation de la matière pour le substrat carboné G dans le réacteur est présenté dans l'Equation 64.

$$\frac{d(G.V_L)}{dt} = -r_G^{net}.V_L + Q_{alimentation}(t).G_{alimentation} \quad \text{Equation 64}$$

L'évolution du volume peut être approximé en premier lieu par l'apport de substrat carboné. Le volume de phase liquide dans le réacteur évolue aussi du fait de l'apport de solution saline, de liquide correcteur de pH, des prélèvements effectués et de l'évaporation. Ces différents éléments sont quantifiés et pris en compte dans le traitement post-expérimentation.

$$\frac{dV_L}{dt} = Q_{alimentation}(t) \quad \text{Equation 65}$$

La combinaison de l'Equation 63 et de l'Equation 65 permet de décrire l'évolution de la concentration en biomasse au cours du temps par l'Equation 66.

$$\frac{dX}{dt} = X \left(\mu - \frac{Q_{alimentation}(t)}{V_L} \right) \quad \text{Equation 66}$$

La combinaison de l'Equation 64 et de l'Equation 65 permet de décrire l'évolution de la concentration en glucose au cours du temps par l'Equation 67.

$$\frac{dG}{dt} = r_G^{net} + \frac{Q_{alimentation}(t)}{V_L} \cdot (G_{alimentation} - G) \quad \text{Equation 67}$$

Si le taux de croissance et la concentration résiduelle en substrat sont constants alors l'Equation 67 est transformé en l'Equation 68.

$$Q_{alimentation}(t) = \frac{r_G^{net}.V_L}{(G_{alimentation} - G)}. \quad \text{Equation 68}$$

Soit

$$Q_{alimentation}(t) = \frac{q_G \cdot X \cdot V_L}{(G_{alimentation} - G)}. \quad \text{Equation 69}$$

Si on considère que la vitesse spécifique de consommation du substrat carboné peut être décrite par l'équation de Herbert-Pirt (Equation 70). Dans cette équation le terme lié à la formation de produit est négligé.

$$q_G = \frac{\mu}{Y_{glucose,X}} + m \quad \text{Equation 70}$$

Alors l'Equation 69 peut être transformée en l'Equation 71 qui décrit l'évolution du débit à appliquer au cours du temps afin de maintenir une concentration en substrat et un taux de croissance constants.

$$Q_{alimentation}(t) = \frac{\left(\frac{\mu}{Y_{glucose,X}} + m \right) \cdot X_0 \cdot V_{L,0} \cdot \exp^{\mu \cdot t}}{(G_{alimentation} - G)}. \quad \text{Equation 71}$$

Si le taux de croissance est constant alors le rendement en biomasse formée par rapport au substrat consommé peut être exprimé par l'Equation 72.

$$R_{Glucose,X} = \frac{\mu}{q_G} = \frac{\mu}{\frac{\mu}{Y_{glucose,X}} + m} \quad \text{Equation 72}$$

De plus, si la concentration résiduelle en substrat G est négligeable devant la concentration dans la solution d'alimentation alors l'Equation 71 peut être substituée par l'Equation 73.

$$Q_{alimentation}(t) = \frac{\left(\frac{\mu}{R_{Glucose,X}} \right) \cdot X_0 \cdot V_{L,0} \cdot \exp^{\mu \cdot t}}{G_{alimentation}} \quad \text{Equation 73}$$

Avec le profil d'alimentation initial défini par l'Equation 74.

$$Q_{alimentation}(t=0) = \frac{\left(\frac{\mu}{R_{Glucose,X}} \right) \cdot X_0 \cdot V_{L,0}}{G_{alimentation}} \quad \text{Equation 74}$$

Donc l'Equation 73 peut être aussi décrite sous la forme de l'Equation 75.

$$Q_{alimentation}(t) = Q_{alimentation}(t=0) \cdot \exp^{\mu \cdot t} \quad \text{Equation 75}$$

A tout moment de la culture il est possible d'imposer un nouveau profil d'alimentation exponentielle avec un taux de croissance différent de celui jusqu'alors utilisé. Le débit

d'alimentation initial de ce nouveau profil est calculé par l'Equation 74. Le terme $\frac{X_0 \cdot V_{L,0}}{R_{Glucose,X}}$

représente la quantité de substrat consommée depuis le début de la culture et est directement accessible à partir des mesures de la masse du bidon d'alimentation.

L'évolution du débit d'alimentation au cours du temps est alors obtenue par l'Equation 76 et l'évolution de la concentration en biomasse au cours du temps par l'Equation 77.

$$V_L(t) = V_{L,0} \cdot \left(1 + X_0 \cdot (\exp^{\mu \cdot t} - 1) \left(\frac{1}{Y_{Glucose,X}} + \frac{m}{\mu} \right) \left(\frac{1}{G_{alimentation} - G} \right) \right). \quad \text{Equation 76}$$

$$X(t) = \frac{X_0 \cdot \exp^{\mu \cdot t}}{1 + X_0 \cdot (\exp^{\mu \cdot t} - 1) \left(\frac{1}{Y_{Glucose,X}} + \frac{m}{\mu} \right) \left(\frac{1}{G_{alimentation} - G} \right)}. \quad \text{Equation 77}$$

2.2.3.1.3 Description du dispositif expérimental

Les cultures continues et continues accélérées sont réalisées dans un fermenteur B. Braun DCU International (B. Braun AG, Melsungen, Allemagne) avec un volume total de 6.948 L. Le diamètre interne de la cuve est de 16.6 cm et le fond de la cuve est concave. 4 contre pales sont disposés dans le réacteur.

Un module Sartorius B-DCU est utilisé pour l'acquisition des signaux et la régulation des variables. L'interface utilisateur est assurée par le logiciel MFCS/win 2.0[®].

L'agitation de la phase liquide est assurée par deux turbines Rushton 6 pales (diamètre externe de 6.3 cm, hauteur des pales de 1.5 cm). Ces deux turbines sont placées à 1 cm et 5.5 cm de l'extrémité inférieure de l'arbre d'agitation.

La ventilation est assurée par un sparger de type O-ring. Le débit d'air est mesuré par un débitmètre massique (Modèle M9203610D, Bronkhrost, Allemagne). L'air est filtré en amont du fermenteur par utilisation d'un filtre 0.2 µm (Modèle Sartofluor, Sartorius Stedim Biotech GmbH, Allemagne).

La température est mesurée par un capteur de température Pt100 en contact avec le moût via un doigt de gant. La valeur de la consigne de température est de 30.00°C. La régulation de cette variable est assurée par une circulation d'eau dans une double enveloppe du réacteur.

Le pH est mesuré par une sonde pH (Modèle Fermprobe[®], Broadley and James Corporation, Santa-Anna, USA). La consigne est fixée à 5.00 et la régulation de cette variable est assurée par une solution de NaOH 2 N.

La pression relative dans le fermenteur est mesurée par un capteur de pression Herose Safety Valve modèle 06-205 (Pressure Systems, Victoria, Australie). La régulation de cette variable est

assurée par une vanne pneumatique (Modèle Flowserve, Kämmer Ventile). La consigne est fixée à 0.1 ou 0.3 bars.

La pression partielle en oxygène dissous est mesurée par une sonde InPro6800® (Mettler Toledo, Greifensee, Suisse). La sonde est calibrée dans le milieu initial de culture à la pression relative de travail à l'aide de di-azote pour ajuster le zéro et d'air pour fixer la pente.

La régulation du niveau de liquide dans le fermenteur se fait par peson. La masse du fermenteur est mesurée par une balance reliée au module Sartorius B-DCU (modèle CH1NE-64E0-S, précision 0.01 g, Sartorius, Goettingen, Allemagne). La régulation de cette variable à la valeur de consigne est assurée par le contrôle de la vitesse de rotation de la pompe de sortie du liquide.

L'alimentation en milieu de culture est assurée par une pompe péristaltique (Modèle 520-DU, Watson-Marlow, Royaume Uni) utilisée avec un flexible de précision en marprene (Watson-Marlow, Royaume Uni). La masse du bidon d'alimentation est mesurée toutes les minutes (balance CH1NE-64E0-S, précision 0.01 g, Sartorius, Goettingen, Allemagne). Le débit massique du milieu d'alimentation est ainsi connu à tout moment.

L'alimentation en liquide correcteur de pH est assurée par une pompe péristaltique de la console Sartorius B-DCU utilisée avec un tuyau de précision en silicone (Masterflex, Beligneux, France). La masse de la bouteille contenant le liquide correcteur de pH est mesurée toutes les minutes (balance CPA5201, précision 0.1 g, Sartorius, Goettingen, Allemagne). Le débit massique du milieu d'alimentation est ainsi connu à tout moment.

La formation de mousse dans le fermenteur est détectée par une sonde antimousse (Sartorius, Goettingen, Allemagne). Le contrôle de la formation de mousse est assurée par un apport en liquide correcteur de type PPG 2000 (Poly- Propylène Glycol, Sigma Aldrich, Allemagne) réalisé par une pompe péristaltique de la console Sartorius B-DCU utilisée avec un tuyau de précision en silicone (Masterflex, Beligneux, France). Le temps de fonctionnement de la pompe antimousse est enregistré et convertie par la suite en volume apporté de liquide correcteur de mousse.



Figure 15. Photographie du dispositif expérimental pour les cultures continues et continues accélérées.

2.2.3.1.4 Conduite de culture

La culture est démarrée en mode batch avec un volume initial égal au volume de culture continu. La phase discontinue dure environ 24h. L'alimentation et le sous-tirage sont mis en place après consommation de l'éthanol et de l'acétate produits durant la phase batch. Le taux de dilution initial est égal au taux de dilution qui est utilisé pour la culture. Le régime permanent est atteint après 5 temps de séjour du liquide.

Pour les cultures continues accélérées (accélérostat) l'augmentation progressive du taux de dilution est mis en place selon l'après caractérisation du régime permanent atteint en culture continue.

$$D(t) = D_0 + \alpha.t \quad \text{Equation 78}$$

Avec D_0 Taux de dilution de la culture continue initiale (h^{-1})

α Accélération du taux de dilution (h^{-2})

A la fin de la culture le volume final de moût est mesuré et pris en compte dans l'ensemble des calculs.

2.3 Techniques analytiques

2.3.1 Stratégie d'échantillonnage

Les prélèvements de moût sont effectués au moyen d'une seringue à travers de septa placés dans des ports inclinés à 15° par rapport à l'horizontale.

Les prélèvements de surnageant sont effectués au moyen d'un module de filtration tangentielle (Applikon, Pays-Bas) associé à un collecteur de fraction (Fraction Collector Frac-100, Pharmacia fine chemicals) comme représenté sur la Figure 16. Le module est placé en ligne sur une boucle de recirculation extérieure au réacteur. La circulation du moût dans la boucle est assurée par une pompe péristaltique (Modèle 77521-57, Masterflex, Beligneux, France). L'ouverture de la vanne pinch permettant le passage du filtrat vers le collecteur de fraction est commandée via le logiciel MFCS/win 2.0[®]. Ce dispositif permet un échantillonnage rapide et sans intervention sur le fermenteur.. La séparation des cellules et du surnageant est quasi instantanée ce qui permet d'éviter une évolution des échantillons lors d'une étape de centrifugation.

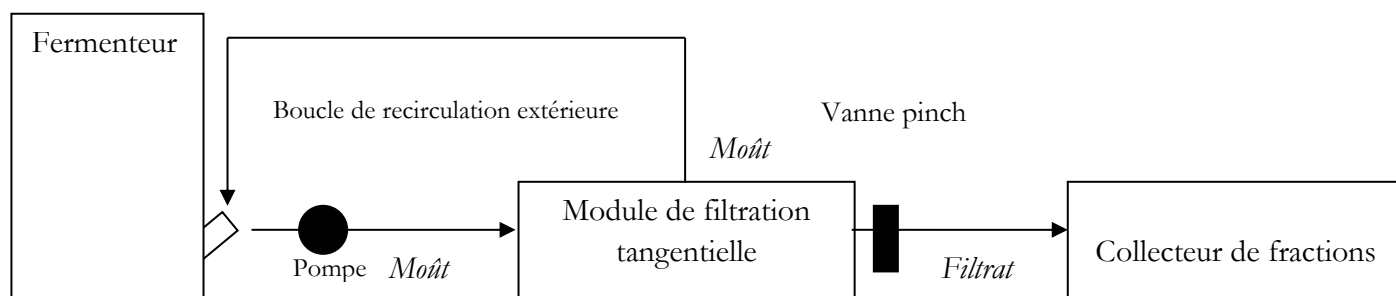


Figure 16. Schéma du dispositif de prélèvement des échantillons de surnageant.

2.3.2 Analyse de la phase biomasse

2.3.2.1 Détermination de la concentration en biomasse

2.3.2.1.1 Méthode turbidimétrique

La concentration cellulaire est estimée par mesure de l'absorbance à 620 nm dans une cuve en verre de 2 mm de trajet optique (U 110 Hitachi, Japon). Le blanc est réalisé avec de l'eau osmosée. Une dilution de l'échantillon est nécessaire afin de rester dans la gamme de linéarité (0 - 0.6) de la mesure.

2.3.2.1.2 Méthode gravimétrique

La concentration cellulaire est mesurée par une méthode gravimétrique. Un volume connu de moût est filtré au moyen d'une pompe à vide (Sartorius, Goettingen, Allemagne) sur un filtre 0.45 μm en polyamide (Sartorius, Goettingen, Allemagne) préalablement séché pendant 48h à l'étuve (Pression absolue de 200 mmHg et 60°C) et pesé. Le filtre avec le gâteau de filtration est ensuite séché durant 48h à l'étuve (Pression absolue de 200 mmHg et 60°C) puis pesé. La concentration cellulaire X (g.L^{-1}) est alors déterminée par la différence des masses sèches du filtre, avant et après filtration, ramenée au volume filtré. Pour chaque point du régime permanent la mesure est réalisée en duplicat ou triplicat.

2.3.2.2 Détermination de la composition élémentaire en biomasse

La composition élémentaire de la biomasse est déterminée en culture continue. Les échantillons pour la détermination de la composition élémentaire de la biomasse sont prélevés en triplicat au moyen d'une seringue et centrifugés (5000 rpm, 5 min, 4°C sur une centrifugeuse Eppendorf 5810 R équipée d'un rotor F-34-6-38 soit une accélération de 3214 g) avant d'être stockés à -18 °C.

En préparation de l'analyse trois lavages successifs à l'eau physiologique (NaCl 9% (w/w)) sont réalisés. Ils sont ensuite lyophilisés durant 48h (Christ Alpha 2-4, Christ Alpha Freeze Drier, Royaume-Uni) et envoyés au Service Central d'Analyse du CNRS (SCA-CNRS, Saclay, France). Les échantillons lyophilisés sont stockés à l'abri de l'humidité par des cristaux de silicagel.

Les teneurs élémentaires en Carbone, Hydrogène, Oxygène, Azote, Phosphore et Souffre sont présentées dans le Tableau 27. La teneur en cendres considérée est de 6%.

Tableau 27. Composition élémentaire de la biomasse déterminée en culture continue.

Element	C	H	O	N	P	S
Fraction	1	1.789	0.531	0.160	0.018	0.003
Ecart-type	-	0.024	0.013	0.002	0.000	0.000

2.3.2.3 Détermination de la teneur intracellulaire en sucres de réserve

Le contenu intracellulaire en glycogène et tréhalose est mesuré en suivant le protocole décrit par (Parrou and François, 1997).

Un échantillon de 0.5 mL de moût (soit environ 10 mg de biomasse) est centrifugé à 3min durant 3 min en utilisant une centrifugeuse de type Minispin (Eppendor) à 13400 rpm (soit 12100 g). Le surnageant est jeté et le culot est rincé avec 1.0 mL d'eau osmosée. Le culot obtenu est alors resuspend dans 250 µL de Na₂CO₃ à 0.25 M. Le mélange est transféré dans un cône eppendorf à vis et incubé à 95°C durant 3h. Après traitement alcalin à chaud le pH du mélange est ajusté à pH 5.2 par addition de 150µL d'une solution d'acide acétique 1 M et de 600 µL d'une solution d'acetate de sodium à 0.2 M.

L'étape d'hydrolyse du tréhalose est réalisée en ajoutant 10µL d'une solution commerciale de tréhalase (3.7 U.mL⁻¹, Sigma-Aldrich, USA) à la solution obtenue après ajustement pH. La solution obtenue est incubé à 37°C durant 48h. L'étape d'hydrolyse du glycogène est réalisée en ajoutant 20 µL de α-amylglucosidase (8 U.mL⁻¹, Sigma-Aldrich, USA) à la solution obtenue après ajustement pH. La solution obtenue est alors incubée à 56°C durant 24h.

Après la fin de l'étape d'hydrolyse les solutions obtenues sont centrifugées en utilisant une centrifugeuse de type Minispin (Eppendor) à 13400 rpm (soit 12100 g) et les surnageant sont

collectés. La quantification de la concentration en glucose dans ces hydrolysats est réalisée en utilisant un kit enzymatique (chapitre 2.3.3.4.1).

2.3.2.4 Thermogravimétrie

La thermogravimétrie est une technique permettant d'évaluer la teneur en eau extracellulaire et eau intracellulaire d'un échantillon de moût par le suivi de sa cinétique de séchage (Uribelarrea et al., 1985).

Un échantillon de moût d'environ 10 mL (correspondant à environ 0.2 g de biomasse) est centrifugé (5000 rpm, 5 min, 4°C sur une centrifugeuse Eppendorf 5810 R équipée d'un rotor F-34-6-38 soit une accélération de 3214 g) avant d'être stockés à -18 °C. Le surnageant est jeté et le culot est resuspendu avec de l'eau osmosée correspondant à 2/3 du volume du culot. 1 mL de la suspension utilisée est placé dans une coupelle et analysé.

L'appareil utilisé est une thermobalance de précision 0.001 g (Modèle LJ16, Mettler Toledo, Suisse). L'analyse dure 120 min et l'échantillon est soumis à une température constante de 75°C. L'acquisition de la masse de la balance est réalisée toutes les 6 s.

Les données sont traitées avec un programme Matlab développé au laboratoire. La cinétique de séchage de l'eau extracellulaire est d'ordre 0 alors que la cinétique de l'eau intracellulaire est d'ordre 1. L'identification du point critique où la rupture de pente se produit et la connaissance de la masse de l'échantillon à ce point critique et au point final permet d'estimer les contenus en eau exocellulaire et intracellulaire.

2.3.3 Analyse de la phase liquide

2.3.3.1 H.P.L.C

Les échantillons de surnageants sont filtrés sur un filtre de 0.2 µm et analysés en chromatographie liquide haute performance (High Pressure Liquid Chromatography, HPLC) avec une colonne H+. Les composés analysés ont fait l'objet d'un étalonnage réalisé à partir de différentes solutions de concentrations connues.

Le chromatographe utilisé (Waters® Alliance 2690) a deux analyseurs : un réfractomètre et un détecteur à barrette d'iode. Le réfractomètre est utilisé pour la détection du glucose, du glycérol et de l'éthanol. Le détecteur à barrettes d'iodes est utilisé pour la détection de l'acétate, du succinate, du pyruvate et du citrate. La colonne Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm) est utilisée et les données sont acquises et analysées par le logiciel Millenium®.

La température du four est fixée à 50°C et une solution d'acide sulfurique H₂SO₄ à 5 mM est utilisée comme éluant à un débit de 0.5 mL.min⁻¹.

2.3.3.2 G.C

Les échantillons de surnageant sont analysés en chromatographie en phase gazeuse (Gas Chromatography, G.C).

L'appareil utilisé (5890A, Hewlett-Packard Co, USA) est muni d'une colonne Poraplot (25m X 0.53 mm) et d'un détecteur à ionisation de flamme FID. Le gaz vecteur est l'azote à une pression de 1.4 bars en tête de colonne. La température de l'injecteur est fixée à 250°C et celle du détecteur à 260°C. L'analyse est réalisée en programmant la température du four de la façon suivante :

$$120^{\circ}\text{C} \quad \rightarrow \quad 225^{\circ}\text{C} \quad \rightarrow \quad 237^{\circ}\text{C} \text{ durant } 5 \text{ min}$$

$$(15^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1}) \quad (40^{\circ}\text{C}.\text{min}^{-1})$$

Les concentrations en éthanol et acétate font fait l'objet d'un étalonnage réalisé à partir de différentes solutions de concentrations connues. La méthode de l'étalon interne est utilisée et l'étalon interne choisi est l'acide propionique 10 g.L⁻¹ préparé dans de l'acide sulfurique à 0.2 N. Les échantillons sont préparés avec les proportions suivantes : 1 volume d'échantillon interne pour 4 volumes de surnageant.

2.3.3.3 Y.S.I

La concentration en glucose résiduel est dosée par un analyseur YSI 2700 (Yellow Spring Instrument, Ohio, Etats-Unis).

La gamme de quantification est de 0.00 - 9.00 g.L⁻¹. L'appareil est étalonné à 2.50 g.L⁻¹. La précision des mesures est de 2% soit 0.018 g.L⁻¹ au maximum.

Le principe de mesure est basé sur deux réactions en série :

- Conversion du glucose en acide gluconique et eau oxygénée par une glucose-oxydase immobilisée : $\text{Glucose} + 2 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Acide gluconique} + 2 \text{H}_2\text{O}_2$
- La détection de l'eau oxygénée H₂O₂ par une électrode de platine crée un flux d'électrons proportionnel à la concentration en glucose.

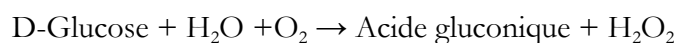
2.3.3.4 Kits enzymatiques

2.3.3.4.1 Glucose

Les échantillons de surnageants sont filtrés sur un filtre de 0.2 µm et la concentration en glucose est analysée en utilisant le kit enzymatique référence GAGO20-1KT (Glucose assay kit, Sigma Aldrich, USA). La gamme de linéarité de la mesure est estimée à 0.0 - 80 mg.L⁻¹. Chaque échantillon est analysé en duplicat.

La quantification de la concentration en glucose est réalisée par une méthode colorimétrique basée sur les trois réactions suivantes :

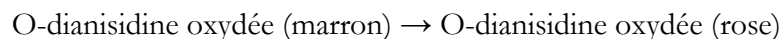
Réaction n°1 (catalysée par l'enzyme glucose oxydase)



Réaction n°2 (catalysée par l'enzyme peroxydase)



Réaction n°3 (catalysée par l'acide sulfurique)



La réaction est initiée par l'ajout de 40 µL d'un réactif comprenant les enzymes Glucose Oxydase et Peroxydase ainsi que le réactif O-dianisidine à 20 µL d'échantillon dans une micro-plaque. Après 30 min d'incubation à 37°C la réaction est arrêtée par ajout de 40 µL de H₂SO₄ 12N. L'absorbance de chaque puit est mesurée à 490 nm et l'intensité de la coloration est proportionnelle à la concentration en glucose.

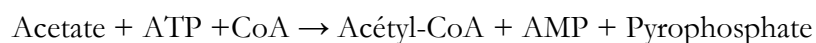
2.3.3.4.2 Acétate

Les échantillons de surnageants sont filtrés sur un filtre de 0.2 µm et la concentration en acétate est analysée en utilisant le kit enzymatique référence 10148261035 (Boehringer Mannheim / R-Biopharm, Allemagne). Le protocole a été adapté à partir du protocole du fournisseur afin de pouvoir réaliser des dosages sur un volume réduit d'échantillon en micro-plaques (Poilpré, 2002)

La gamme de linéarité de la mesure est estimée à 0.0 - 60 mg.L⁻¹. Chaque échantillon est analysé en duplicat.

La quantification de la concentration en acétate est réalisée par une méthode colorimétrique basée sur les trois réactions suivantes :

Réaction n°1 (catalysée par l'acétyl-CoA synthétase)



Réaction n°2 (catalysée par l'enzyme citrate synthase)



Réaction n°3 (catalysée par la malate déshydrogénase)



Le protocole adopté est décrit sur la Figure 17. Les mesures d'absorbance sont réalisées à 340 nm et nécessitent donc l'utilisation de micro-plaques n'absorbant pas dans les U.V. La solution n°1 du kit contient un tampon à pH 8.4, du L-malate et du chlorure de magnésium. La solution n°2 du kit comprend du NAD⁺, de l'ATP et du CoA. La solution n°3 du kit comprend les enzymes

malate déshydrogénase et citrate synthase. La solution n°4 du kit comprend de l'acétyl-CoA synthétase.

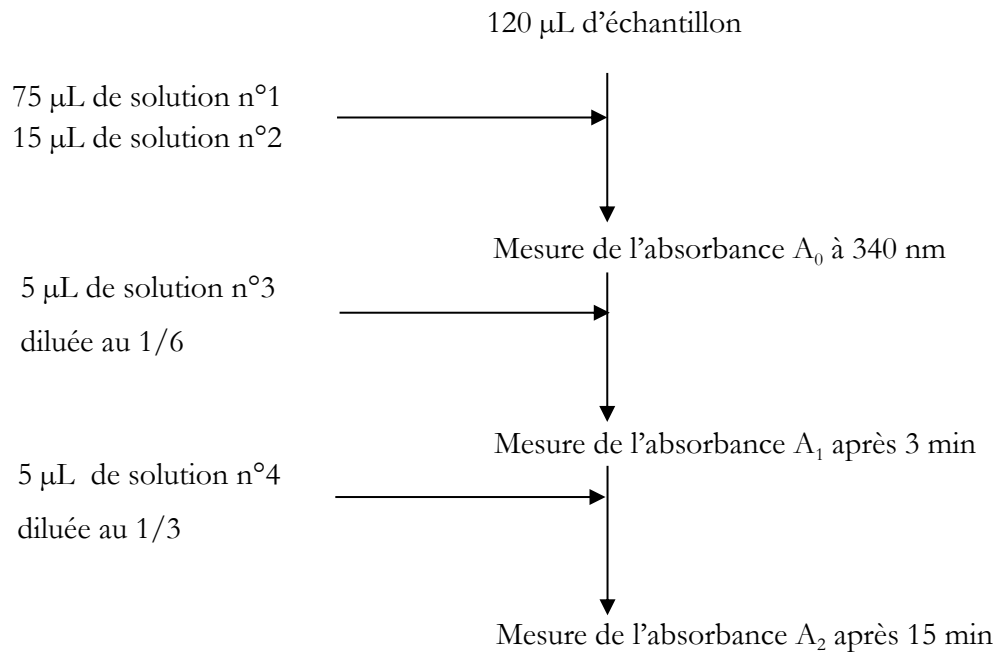


Figure 17. Principe de la quantification de la concentration en acétate par méthode colorimétrique.

La valeur du delta absorbance est calculée pour chaque échantillon (Equation 79). Une courbe de calibration $\Delta\text{Absorbance} = f([\text{Acetate}])$ permet de remonter à la concentration en acetate d'un échantillon à partir de la mesure de $\Delta\text{Absorbance}$.

$$\Delta\text{Absorbance}_{\text{acetate}} = \left((A_2 - A_0) - \frac{(A_1 - A_0)^2}{(A_2 - A_0)} \right)_{\text{échantillon}} - \left((A_2 - A_0) - \frac{(A_1 - A_0)^2}{(A_2 - A_0)} \right)_{\text{blanc}}$$

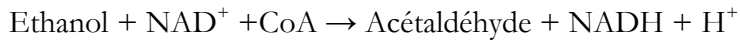
Equation 79

2.3.3.4.3 Ethanol

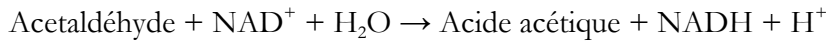
Les échantillons de surnageants sont filtrés sur un filtre de 0.2 µm et la concentration en éthanol est analysée en utilisant le kit enzymatique référence 10076290035 (Boehringer Mannheim / R-Biopharm, Allemagne). Le protocole a été adapté à partir du protocole du fournisseur afin de pouvoir réaliser des dosages sur un volume réduit d'échantillon en micro-plaques (Poilpré, 2002). La gamme de linéarité de la mesure est estimée à 0.0 - 60 mg.L⁻¹. Chaque échantillon est analysé en duplicat.

La quantification de la concentration en éthanol est réalisée par une méthode colorimétrique basée sur les deux réactions suivantes

Réaction n°1 (catalysée par l'alcool déshydrogénase)



Réaction n°2 (catalysée par l'enzyme citrate synthase)



Le protocole adopté est décrit sur la Figure 17. Les mesures d'absorbance sont réalisées à 340 nm et nécessitent donc l'utilisation de micro-plaques n'absorbant pas dans les U.V. La solution n°2 du kit contient un tampon à pH 9, du NAD^+ et l'enzyme acétaldéhyde déshydrogénase. La solution n°2 du kit comprend l'enzyme alcool déshydrogénase.

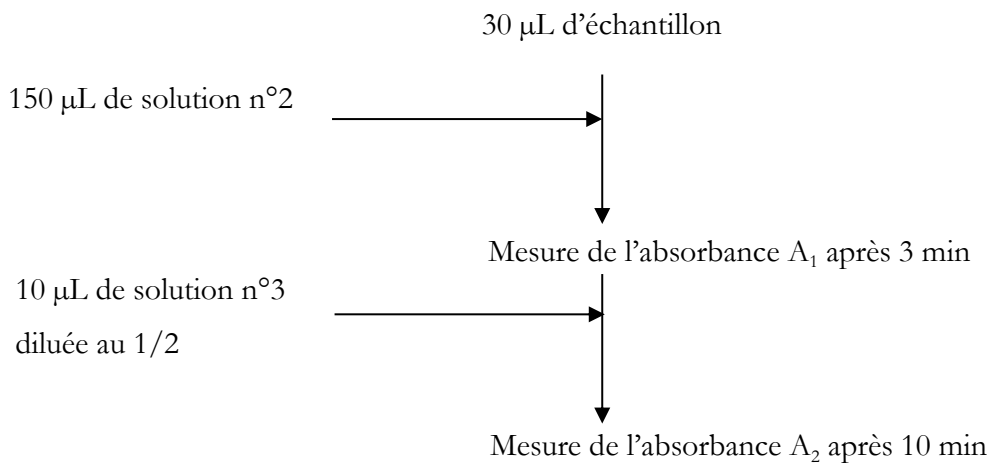


Figure 18. Principe de la quantification de la concentration en éthanol par méthode colorimétrique.

La valeur du delta absorbance est calculée pour chaque échantillon (Equation 80). Une courbe de calibration $\Delta\text{Absorbance} = f([\text{Ethanol}])$ permet de remonter à la concentration en éthanol d'un échantillon à partir de la mesure de $\Delta\text{Absorbance}$.

$$\Delta\text{Absorbance}_{\text{acetate}} = (A_2 - A_1)_{\text{échantillon}} - (A_2 - A_1)_{\text{blanc}} \quad \text{Equation 80}$$

2.3.3.5 ICP-MS

La spectrométrie par torche à plasma (ICP-MS : Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry) est une technique de quantification des éléments inorganiques présents dans un échantillon. Cette technique est utilisée pour la quantification des concentrations des ions K^+ et Mg^{2+} dans la phase liquide. L'appareil utilisé est un spectromètre Agilent 7700 Series (Agilent, USA). Le principe de l'analyse est brièvement présenté.

L'échantillon est ajouté en continu dans une chambre d'introduction par une pompe péristaltique. Dans le nébuliseur les solutions sont mises sous forme d'aérosol par de l'argon utilisé comme gaz vecteur. L'aérosol est alors introduit dans la torche ICP MS.

Le plasma de la torche est créé par l'ionisation du gaz Argon ($\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + e^-$) par un courant électrique fourni par un générateur entourant en spires la torche. Le plasma est un état de la matière similaire à l'état gaz mais où une partie des particules sont ionisées. La température est élevée dans le plasma (8000 K) ce qui sèche les gouttes de l'aérosol et divise la plupart des molécules en atomes simples. Ces atomes sont ensuite mis sous forme d'ions par les électrons du plasma ($\text{M} \rightarrow \text{M}^+ + e^-$). Pour un élément donné la fraction d'atomes qui passe sous forme d'ions dépend du potentiel d'ionisation de l'élément. L'argon est utilisé comme gaz vecteur car il a un potentiel d'ionisation élevé (énergie requise pour enlever un électron à une molécule), donc la réaction $\text{Ar} \rightarrow \text{Ar}^+ + e^-$ est plus énergétiquement favorable que $\text{M} \rightarrow \text{M}^+ + e^-$, ce qui assure que les éléments M restent sous forme ionisée et seront donc détectés.

L'interface entre la torche à plasma et la cellule ORS est constituée par l'association d'une lentille et de trois skimmers coniques. La lentille est polarisée et extrait les éléments chargés positivement du flux d'ions du plasma en déviant leurs trajectoires. Les particules neutres ne sont pas déviées et ne passent donc pas par les cônes. Les cônes (orifice de 0.3 mm de diamètre) permettent de focaliser le flux d'ions positifs déviés par la lentille et de maintenir le vide dans les compartiments de séparation et d'analyse. L'interface est sous vide primaire (133 Pa) assuré par la pompe primaire extérieure afin d'éviter que les analyses soient contaminées par l'air ambiant.

L'ORS (Octopole Reaction System), le quadripole et le détecteur sont sous vide secondaire ($5 \cdot 10^{-4}$ Pa), assuré d'une part par la pompe primaire et complété d'autre part par une pompe turbomoléculaire plus puissante que la pompe primaire et située entre le quadripole et le détecteur.

Deux types majeurs d'interférence compliquent l'analyse du spectre obtenu en ICP-MS

- Les interférences isobariques. Elles surviennent lorsque les isotopes de plusieurs éléments ont la même masse. Il est possible de s'affranchir de ce type d'interférence en sélectionnant pour l'analyse de chaque élément un isotope non sujet à recouvrement. Pour les éléments où ce choix n'est pas possible il est toujours possible d'utiliser une équation de correction du signal.
- Les interférences poly-atomiques résultent de la combinaison d'ions. Ces molécules recouvrent en partie les masses des éléments à analyser et augmentent donc le bruit d'analyse.

L'ORS permet d'améliorer la qualité du signal en supprimant les interférences polyatomiques. Dans l'ORS un contre-courant d'Hélium est appliqué (mode Helium): les particules

polyatomiques ont une probabilité plus importante de collision avec les atomes d'hélium que les éléments chargés positivement à analyser. La collision provoque une perte d'énergie cinétique des molécules polyatomiques et donc la diminution du bruit lié à ces molécules polyatomiques.

Dans le quadripole les ions sont séparés selon le ratio charge/masse m/z par des champs magnétiques appliqués aux quatre barreaux. Sur un intervalle de temps donné seuls les ions avec un certain ratio m/z auront une trajectoire stable au sein du quadripole et seront transmis au détecteur. Le quadripole agit donc comme un filtre sélectif sur le faisceau d'ions.

Le détecteur utilisé est un électromultiplicateur. Un ion de ratio m/z donné frappant la surface du détecteur provoque l'émission d'un flux d'électrons depuis les couches externes des atomes de surface du détecteur. Ce phénomène est appelé émission secondaire d'électrons. Le flux d'électrons est amplifié dans une série de dynodes pour générer un courant électrique. Le signal est ensuite traité pour relier le flux d'électrons au flux d'ions et donc à la concentration d'un élément donné dans l'échantillon.

Les échantillons de surnageant sont minéralisés par dilution dans une solution d'acide nitrique HNO_3 1% (w/w) puis filtrés ($0.22\ \mu\text{m}$). La minéralisation a pour but de minimiser la formation d'hydroxyde pouvant créer des précipitations et d'éviter l'adsorption de certains éléments sur les éléments en quartz de l'appareil.

L'Indium I^{115} à une concentration de $100\ \mu\text{g.L}^{-1}$ est utilisé en étalon interne et est ajouté en parallèle de l'échantillon. Les analyses sont réalisées en mode quantitatif : le signal obtenu pour chaque élément du spectre (en CPS) à une concentration au moyen d'une gamme étalon établie par l'utilisateur au préalable. Pour chaque échantillon 5 analyses sont effectuées.

Le temps d'intégration choisi pour le potassium est de 0.1 s en mode no-gas (pas de contre-courant d'Helium dans l'ORS) et de 0.01 s en présence d'hélium afin d'éviter la saturation du détecteur. Le temps d'intégration choisi pour le magnésium est de 0.01 s en mode no-gas.

2.3.4 Paramètres physico-chimiques et rhéologiques

2.3.4.1 Viscosité dynamique

Les analyses ont été réalisées sur un rhéomètre Bohlin C-Vor 200 à l'Institut de Mécanique des Fluides de Toulouse (I.M.F.T). Le rhéomètre fonctionne selon un principe rotationnel cône-plan. Le diamètre du plan est de 60 mm, l'angle d'ouverture de 2° et l'entrefer entre le cône et le plan de $70\ \mu\text{m}$. Préalablement à chaque analyse une vitesse de cisaillement de $300\ \text{s}^{-1}$ est appliquée durant 20 s, suivie d'une phase de repos de 10s. L'analyse est ensuite par paliers de vitesses de cisaillement. La plage de vitesses de cisaillement étudiée est $[1 ; 200]\ \text{s}^{-1}$. Le calcul de la viscosité apparente est réalisé pour la plage de vitesses de cisaillement étudiée est $[10 ; 200]\ \text{s}^{-1}$. En effet :

- Pour des vitesses de cisaillement supérieures à 200 s^{-1} la mesure est biaisée par apparition d'effet d'inertie.
- Pour des vitesses de cisaillement inférieures à 10 s^{-1} la valeur du couple M est inférieure à la limite inférieure de quantification du couple ($[5.10^{-8} - 0.2 \text{ Nm}]$). De plus l'impact de l'erreur sur la mesure du couple (5.10^{-8} Nm) par rapport à la mesure du couple est important pour des vitesses de cisaillement comprises entre 1 et 10 s^{-1} (de 50.2 à 9.5 %) mais peut être négligeable pour des vitesses de cisaillement comprises entre 10 et 200 s^{-1} (de 9.5 à 0.4 %).

La viscosité est une grandeur thermodépendante. Les analyses sont donc réalisées à $30.0 \text{ }^{\circ}\text{C}$, température de culture.

Les analyses ont été réalisées à $t + 12$ jours sur des échantillons stockés à 4.0°C . Il a été montré que la durée de stockage influait sur la valeur de la viscosité apparente. Il a été rapporté une augmentation de la viscosité apparente pour des échantillons analysés à $t + 6$ jours par rapport à des échantillons analysés à $t + 2\text{h}$ (Manon, 2012). Cette dérive est surtout vérifiée pour de faibles vitesses de cisaillement ($< 10 \text{ s}^{-1}$) et ne devrait donc pas impacter nos mesures de viscosité apparentes réalisées pour des vitesses de cisaillement plus importantes ($>10 \text{ s}^{-1}$).

2.3.4.2 Tension de surface

La mesure de la tension superficielle est réalisée selon la méthode statique d'arrachement de la lame de Wilhelmy par un tensiomètre de type Digidrop GBX 3S (GBX, France). La précision de mesure de cet appareil est de 0.5 mN.m^{-1} pour la méthode statique d'arrachement de l'anneau du Nouy (Painmanakul, 2005) et de 0.01 mN.m^{-1} pour la méthode utilisée ici (cette étude).

La lame de Wilhemy utilisée est en platine et doit être parfaitement mouillable. Elle est nettoyée par calcination avant chaque mesure.

Les mesures sont réalisées en triplicat sur des échantillons de surnageant et de moût. Les échantillons de surnageant sont obtenus par centrifugation des moûts de fermentation (5000 rpm, 5 min, 4°C sur une centrifugeuse Eppendorf 5810 R équipée d'un rotor F-34-6-38 soit une accélération de 3214 g).

L'appareil n'est pas adapté aux faibles volumes d'échantillon disponibles pour la manipulation (10-30 mL). Un adaptateur en polystyrène a donc été utilisé. De plus, l'appareil n'est pas thermostaté. Or la tension superficielle évolue comme une fonction linéaire inverse en fonction de la température. Il n'est pas possible d'effectuer une correction par le calcul car la composition des échantillons n'est pas parfaitement définie et connue. Les échantillons sont donc d'abord réchauffés à $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$ dans un bain thermostaté. La série de mesure est commencée lorsque la

température de l'échantillon atteint 32 °C environ et stoppé au bout de trois répétitions. La température finale de l'échantillon est alors de 28 °C environ. Pour chaque échantillon la température initiale de mesure et la température finale de mesure sont relevés. L'augmentation de la tension superficielle de l'eau pure pour cet écart de température est alors calculée pour avoir une estimation de l'évolution de la tension superficielle liée à l'évolution de la température entre le début et la fin de la série de mesures. Cette dispersion est dans tous les cas inférieure à 1.24 mN.m⁻¹. L'écart type des valeurs de tension superficielle obtenues pour un triplicat est également calculé et est inférieure à 0.72 mN.m⁻¹.

2.3.4.3 Masse volumique

Les déterminations de masse volumique sont réalisées par un densimètre de Modèle DE40 (Mettler Toledo, Greifensee, Suisse).

Le volume de la cellule de mesure est de 1.200 mL. Afin d'obtenir une mesure fiable il est nécessaire de rincer la cellule de mesure par trois volumes d'échantillons avant de réaliser la mesure. Le volume minimum d'échantillon pour une mesure est donc de 4.800 mL. Chaque mesure est réalisée en triplicat. La moyenne des trois mesures et l'écart type associé sont calculés. L'écart type est inférieur à 0.3 kg.m⁻³ pour les mesures de surnageant et inférieur à 0.5 kg.m⁻³ pour les mesures de moût.

Pour chaque culture la densité de la solution d'alimentation et la densité du liquide correcteur de pH sont mesurées à 20°C. La densité du moût et du surnageant est mesurée à 30°C après un temps de repos de 20 min nécessaire au dégazage de l'échantillon.

2.3.5 Mesure de la puissance dissipée

La puissance dissipée e correspond à la somme de la puissance dissipée par l'agitation du moût de fermentation par le système d'agitation et par l'expansion des gaz utilisés pour la ventilation. La puissance dissipée par la ventilation peut être négligée pour des vitesses superficielles supérieures à 1.0 cm.s⁻¹ (Trambouze and Euzen, 2002) et/ou pour des puissance dissipées totales supérieures à 1000 W.m⁻³ (Van't Riet and Tramper, 1991).

La mesure directe de la puissance dissipée lors des cultures est impossible : En effet la console Biostat E donne une estimation de la puissance consommée à partir de la mesure de la vitesse de rotation de l'axe du moteur électrique. Le tachymètre mesurant cette variable est endommagé et l'estimation de la puissance totale consommée est imprécise (± 50 W sur une puissance totale du moteur de 750 W).

Les techniques de mesure directe de la puissance dissipée ont en général une précision de $\pm 10\%$ (Gogate et al., 2000). Du fait de l'impossibilité d'une mesure directe, la puissance électrique consommée par le moteur électrique est calculée à partir de corrélations empiriques disponibles dans la littérature.

La puissance électrique P_g consommée en réacteur agité aéré est une fonction de la géométrie du module d'agitation, de son positionnement sur l'arbre d'agitation, du nombre de modules d'agitation, de la vitesse de rotation de l'arbre d'agitation, du volume de liquide et du débit de ventilation. Les caractéristiques géométriques du réacteur utilisé pour la culture discontinue alimentée sont résumées dans le Tableau 28. La nomenclature utilisée est celle définie par Roustan (Roustan et al., 1999).

Tableau 28. Caractérisation géométrique du réacteur Biostat E.

Dimension	Signification	Valeur (cm, sauf indiqué)
H_T	Hauteur de réacteur	63.00
D	Diamètre interne du réacteur	21.30
H	Hauteur du liquide (pour $V = 10L$)	28.50
V_T	Volume total utile du réacteur	22.86 (L)
n_p	Nombre de pales sur un mobile	6
d	Diamètre externe du mobile d'agitation	8.40
d_i	Diamètre interne du mobile d'agitation	5.30
l	Longueur des pales	2.50
w	Hauteur des pales	1.70
nc	Nombre de chicanes	4
b	Largeur des chicanes	2.00
h	Hauteur des chicanes	46.00
b'	Distance entre une chicane et la paroi	0.40
Y	Distance entre le centre du mobile d'agitation inférieur et le fond du réacteur	5.00

La géométrie d'une cuve standard est caractérisée par le calcul de rapports de dimensions (Tableau 29).

Tableau 29. Rapports de dimensions géométriques.

Rapport	Valeur pour une cuve dite standard (Roustan et al., 1999)	Valeur pour le réacteur C- DCU
H/D (pour V = 10 L)	1	1.33
d/D	0.33	0.39
Y/d	1	0.59
b'/D	0.02	0.047

Le volume V de liquide évolue au cours de la culture du fait de la conduite en mode fed-batch. Les dimensions du réacteur C-DCU sont donc différentes de celles d'une cuve standard définies par Rushton (Roustan et al., 1999), en particulier les ratios H/D et Y/D sont très différents des ratios dits idéaux. Le ratio H/D est très supérieur à 1 de façon à augmenter le temps de séjour des bulles pour une vitesse superficielle donnée par rapport à une cuve standard. De même le ratio Y/d est très inférieur à 1, ce qui assure un cisaillement efficace des bulles dès leur sortie du diffuseur.

Calcul du nombre de puissance N_{p0} pour un mobile d'agitation

Le nombre de puissance N_{p0} du mobile d'agitation de type turbine Rushton à 6 pales droites n'est pas donné par le constructeur. Il est donc estimé à partir de données constructeurs en prenant en compte les dimensions des turbines Rushton utilisées dans l'étude et la configuration géométrique du réacteur (Roustan, 2005). Les hypothèses générales définies par Roustan pour la détermination du nombre de puissance dans le cas de mobiles d'agitation à débit radial (Roustan, 2005) sont résumées dans le Tableau 30.

Tableau 30. Hypothèses générales pour le calcul du N_{p0} dans le cas de mobiles d'agitation à débit radial.

Paramètre	Valeur selon (Roustan, 2005)	Valeur dans l'étude
Reynolds	$> 10^4$ (régime turbulent) : N_p constant	$> 10^5$
H/D	1	> 1.33
b'/D	0.02	0.047

Plusieurs données de constructeurs se rapprochent de la configuration utilisée dans l'étude (Tableau 31). Le nombre de puissance moyen pour un mobile d'agitation comparable aux de 5.23.

Tableau 31. Estimation du nombre de puissance pour un mobile d'agitation de type turbine Rushton utilisé dans une configuration géométrique proche de celle de l'étude (Roustan, 2005).

Configuration	N_p	Référence
$n_p = 6$; $n_c = 4$, $w/d = 0.2$, $l/d = 0.25$, $d/D = 0.33$, $Y/d = 1$	5	(Uhl and Gray, 1966)
$n_p = 6$; $n_c = 4$, $w/d = 0.2$, $l/d = 0.25$, $0.27 < d/D < 0.52$, $Y/d = 1$	5.3	(Roustan, 1978)
$n_p = 6$; $n_c = 4$, $w/d = 0.2$, $l/d = 0.25$, $0.3 < d/D < 0.45$, $Y/d = 1$	5.4	(Pharamond, 1973)

Cette valeur du nombre de puissance N_{p0} pour un mobile d'agitation est proche de la gamme 5.5 -6.5 estimée par Van't Riet pour une turbine Rushton 6 pales dans le cas d'un écoulement turbulent ($Re > 10^4$) et d'un réacteur de géométrie $w = 0.2 D$ (Van't Riet and Tramper, 1991).

Calcul de la puissance dissipée en l'absence d'agitation

La puissance dissipée en réacteur agité non aéré P_0 pour un réacteur mono-turbine est calculée selon l'Equation 81.

$$P_0 = N_{p0} \cdot \rho \cdot N^3 \cdot d^5 \quad \text{Equation 81}$$

Avec	P_0	puissance dissipée en réacteur agité non aéré (W)
	N_{p0}	nombre de puissance caractéristique d'un mobile d'agitation (adimensionnel)
	ρ	masse volumique du fluide ($\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$)
	N	vitesse de rotation de l'arbre d'agitation (s^{-1})
	d	diamètre externe d'un mobile d'agitation (m)

Calcul de la puissance dissipée en réacteur agité aéré

Dans le cas d'un fluide newtonien la puissance dissipée en réacteur agité aéré est inférieure à la puissance dissipée en réacteur agité non aéré dans les mêmes conditions d'agitation. Dans le cas d'un liquide agité non aéré la zone derrière les pales d'agitation est en dépression par rapport au reste de la phase liquide et des tourbillons y sont créés. Dans le cas d'un liquide agité aéré des cavités tourbillonnaires de gaz sont créés derrière les pales, ce qui réduit la consommation de puissance.

La puissance dissipée en réacteur agité aéré est calculée à partir de corrélations données dans la littérature. Trois corrélations sont couramment utilisées :

- Corrélation de Michel-Miller (Equation 82) (Michel and Miller, 1962)

$$P_g = a \cdot \left(\frac{P_0^2 \cdot N \cdot d^3}{Q^{0.56}} \right)^b \quad \text{Equation 82}$$

Avec	P_0	puissance dissipée en réacteur agité non aéré (W)
	N_{p0}	nombre de puissance caractéristique d'un mobile d'agitation (adimensionnel)
	N	vitesse de rotation de l'arbre d'agitation (s^{-1})
	d	diamètre externe d'un mobile d'agitation (m)
	Q	débit de ventilation ($m^3.s^{-1}$)

La corrélation de Michel et Miller a été établie pour un réacteur agité par un système mono-turbine dans la gamme de paramètres opératoires $Q \in 9.43.10^{-7} - 2.21.10^{-4} m^3.s^{-1}$, $P \in 1 - 149 W$. Cette gamme de paramètres est généralement considérée insuffisante (Van't Riet and Tramper, 1991). De plus, si le débit de ventilation est nul alors la puissance dissipée est nulle selon cette corrélation (elle devrait être égale à P_0).

Des essais de détermination de la puissance dissipée avec cette corrélation en prenant $a = 1.224$ et $b = 0.432$ (Gogate et al., 2000). Ces paramètres ont été obtenus pour un diamètre de réacteur D de 0.37 m et pour une gamme de paramètres opératoires $N \in 3 - 16 s^{-1}$ et $Q \in 4.2 - 16.7 m.s^{-1}$.

▪ Corrélation de Hughmark (Equation 83) (Hughmark, 1980)

La corrélation de Hughmark a été établie à partir de données expérimentales obtenues pour des réacteurs agités aérés par un système mono-turbine dans la gamme $D \in 0.10 - 3.3 m$. L'erreur absolue moyenne entre la puissance estimée par cette corrélation et la puissance réellement consommée est de 11.7 %, ce qui est considérée comme acceptable au vu de la précision des techniques de mesure directe de la puissance dissipée (Cui et al., 1996; Van't Riet and Tramper, 1991).

$$P_g = 0,1.P_0 \cdot \left(\frac{Q}{N.V_L} \right)^{0.25} \left(\frac{N^2.d^4}{g.w.V_L^{\frac{2}{3}}} \right)^{-0.2} \quad \text{Equation 83}$$

Avec	P_0	puissance dissipée en réacteur agité non aéré (W)
	N_{p0}	nombre de puissance caractéristique d'un mobile d'agitation (adimensionnel)
	N	vitesse de rotation de l'arbre d'agitation (s^{-1})
	d	diamètre externe d'un mobile d'agitation (m)
	Q	débit de ventilation ($m^3.s^{-1}$)
	V_L	volume de phase liquide (m^3)
	w	hauteur des pales du mobile d'agitation (m)

Cette corrélation présente l'avantage de prendre en compte le volume de la phase liquide, qui est une variable dans le cas d'une culture conduite en mode fed-batch. La corrélation de Hughmark a été utilisée au laboratoire pour établir les corrélations empiriques utilisées par la suite pour le

calcul du hold-up (Fyferling, 2007; Fyferling et al., 2008). La corrélation de Hughmark a été établie pour le domaine de validité suivant : $D \in 0.10 - 3.30 \text{ m}$ et $d/D \in 0.25 ; 0.58$.

On remarque cependant que si le débit de ventilation est nul alors la puissance dissipée est nulle selon cette corrélation (elle devrait être égale à P_0).

- Corrélations de Cui (Cui et al., 1996)

Les corrélations de Michel-Miller et de Hughmark ont été établies pour des réacteurs agités par un système mono-turbine. Ces corrélations sont souvent appliquées pour calculer la puissance dissipée dans le cas de réacteurs aérés agités par des systèmes multi-turbines (Cui et al., 1996; Van't Riet and Tramper, 1991). Dans ce cas il est généralement considéré qu'il faut multiplier le nombre de puissance N_{p0} est multiplié par le nombre n de turbines actives (Trambouze and Euzen, 2002).

Cette hypothèse n'est cependant pas valable dans toutes les configurations. En effet dans le cas d'un système agité non aéré le nombre de puissance N_{p0} d'un arbre d'agitation à deux turbines Rushton est égal à deux fois le nombre de puissance d'un système avec une seule turbine de mêmes dimension si la distance inter-turbines est supérieure à $2d$ (Hudcova et al., 1989). Dans notre cas les distances inter turbines sont de $1.54 d$ (turbine inférieure-turbine moyenne) et $1.42 d$ (turbine moyenne – turbine supérieure). Le nombre de puissance N_{p0} d'un système à deux turbines serait alors environ de 1.9 fois le nombre de puissance d'un système à turbine unique dans les deux cas (Gogate et al., 2000; Hudcova et al., 1989). Aucune étude de ce genre n'est disponible pour une agitation par trois turbines Rushton. Il paraît donc acceptable d'obtenir le nombre de puissance N_{p0} de notre système à trois turbines en multipliant le nombre de puissance d'un système mono-turbine (5.23) par le nombre de turbines (3). Les deux turbines inférieures sont actives dès le début de la culture. La troisième turbine est atteinte pour un volume expansé de 10.5 L soit quasiment dès le début de la culture. L'activation de la troisième turbine est prise en compte dans les calculs.

Dans le cas d'un réacteur aéré agité par un système tri-turbines il a été montré expérimentalement que la réduction de la puissance dissipée en conditions d'aération est plus importante pour le mobile d'agitation inférieure que pour les deux mobiles d'agitation supérieurs (Cui et al., 1996). Ceci est dû au fait que le sparger est situé juste au-dessous du mobile d'agitation inférieur, donc la plus grande partie du débit d'aération passe par ce mobile. Au contraire le contact des deux mobiles d'agitation supérieurs avec la phase gaz dépend de la rétention gazeuse.

Cui a développé des corrélations empiriques basées sur des données expérimentales obtenues pour des systèmes multi-turbines (Cui et al., 1996; Gogate et al., 2000). Il distingue le cas du mobile d'agitation inférieur (Équation 84 et Équation 85) et celui des deux mobiles d'agitation supérieurs (Équation 86 et Équation 87). La puissance dissipée totale est obtenue en additionnant la puissance dissipée par le mobile inférieur et par les deux mobiles supérieurs.

L'erreur moyenne entre la puissance dissipée calculée par ces corrélations et la puissance dissipée réelle est plus faible que celle obtenue avec la corrélation de Hughmark (dans tous les cas inférieure à 6% pour un mobile). De plus, l'utilisation de ces corrélations permet le calcul d'une puissance dissipée égale à P_0 dans le cas d'un débit de ventilation nul. Enfin, ces corrélations sont valables dans une large gamme de paramètres : $0.238 < D < 1.83$, $0.9 < N < 10$, $0.33 < d/D < 0.5$ et $0 < Q/(N.d^3) < 0.26$. L'utilisation de ces corrélations est donc recommandée dans le cas d'un réacteur aéré agité par un système multi-turbines (Gogate et al., 2000).

- Mobile d'agitation inférieur si $Q.N^{0.25}/d^2 < 0.055$ (erreur moyenne < 6%)

$$1 - \frac{P_g}{P_0} = 9.9 \frac{Q.N^{0.25}}{d^2} \quad \text{Équation 84}$$

- Mobile d'agitation inférieur si $Q.N^{0.25}/d^2 > 0.055$ (erreur moyenne < 6%)

$$1 - \frac{P_g}{P_0} = 0.52 + 0.62 \frac{Q.N^{0.25}}{d^2} \quad \text{Équation 85}$$

- Mobiles d'agitation supérieurs si $Q.N < 0.013$ (erreur moyenne 2.3 %)

$$1 - \frac{P_g}{P_0} = 37.6 Q.N \quad \text{Équation 86}$$

- Mobiles d'agitation supérieurs si $Q.N > 0.013$ (erreur moyenne 1.4 %)

$$1 - \frac{P_g}{P_0} = 0.375 + 8 Q.N \quad \text{Équation 87}$$

Avec P_g	puissance dissipée pour un système agité aéré (W)
P_0	puissance dissipée pour un système agité non aéré (W)
N	vitesse de rotation de l'arbre d'agitation (s^{-1})
d	diamètre externe d'un mobile d'agitation (m)
Q	débit de ventilation ($m^3.s^{-1}$)

La corrélation de Cui donne une estimation de la puissance dissipée supérieure de 25 à 45 % supérieure à celle de Hughmark. La puissance dissipée est calculée par la corrélation de Michel-

Miller est intermédiaire entre ces deux corrélations. La corrélation de Hughmark est choisie comme référence car elle minimise la puissance dissipée.

Lors d'une culture fed-batch de la levure *Saccharomyces cerevisiae* la puissance totale dissipée en milieu agité aérée est estimée à 549 ± 10 W pour la corrélation de Hughmark, à 643 ± 7 W pour la corrélation de Michel-Miller et à 700 ± 6 W pour les corrélations de Cui lorsque la vitesse d'agitation est maximale ($N = 1500$ rpm). Ces valeurs de puissance sont donc inférieures à la valeur maximale fournie par le moteur (746 W soit 1.01 ch).

La puissance dissipée par unité de volume e est alors calculée par l'Équation 88.

$$e = \frac{P_g}{V_L} \quad \text{Équation 88}$$

Avec e puissance dissipée par unité de volume ($\text{W} \cdot \text{m}^{-3}$)
 V_L volume liquide (m^3)
 P_g puissance dissipée en présence de ventilation (W)

2.3.6 Capteurs à CO_2 dissous

Deux capteurs à CO_2 dissous sont utilisés dans cette étude : la sonde YSI8500 (Yellow Spring Instrument, Yellow Springs, USA) pour la culture discontinue alimentée et la sonde InPro5000 pour les cultures continues (Mettler, Toledo, Suisse). Une comparaison de ces deux sondes est proposée dans le

La sonde InPro5000 est basée sur le principe de Severinghaus (Severinghaus, 1958). Une membrane perméable (silicone et PTFE) sépare le moût et la cellule de mesure. Le CO_2 dissous diffuse depuis le moût à travers la membrane et modifie alors le pH de l'électrolyte contenu dans la cellule de mesure. La variation de pH est mesurée par une micro électrode pH et peut être reliée à une variation de la pression partielle de CO_2 dissous dans le milieu via un doubleétalonnage (étalonnage de la sonde pH et étalonnage de la pression partielle en CO_2 dissous).

La sonde YSI8500 possède une membrane en silicone perméable au CO_2 dissous. La diffusion du CO_2 dissous depuis le moût dans la cellule de mesure modifie le pH d'une solution d'électrolyte et donc le ratio des formes l'équilibre des formes acide et basique de l'acide Hydroxypyrene trisulfonique HPTS présent dans la capsule. Or les deux formes HPTS et PTS^- atteignent des maxima de fluorescence pour des longueurs d'onde d'excitation différentes. La mesure de la fluorescence de la sonde HPTS/ PTS^- est donc réalisée à deux longueurs d'onde différentes et le ratio obtenu est relié à la concentration en CO_2 dissous dans le milieu.

Tableau 32. Comparaison des sondes à CO₂ dissous utilisées.

Paramètre	InPro5000	YSI8500
Linéarité	0-100%	0-25%
Précision (relative)	± 10 %	± 5 %
Temps de réponse(s) (données constructeur)	54	155
Pression maximale (bars)	3	2
Température maximale (°C)	130	132
Dérive	< 10% sur trois mois	< 2% sur une semaine

L'identification de la constante de temps caractéristique de la réponse dynamique d'une sonde est réalisée en étudiant la réponse de cette sonde à un échelon de concentration. Une spin-flask à température thermostatée à 30°C (flacon A) et une bouteille à col étroit contenant de l'eau osmosée à 30°C (Flacon B) sont utilisés pour les essais. Les deux bouteilles contiennent un agitateur magnétique pour assurer l'homogénéité de la phase liquide. Dans la bouteille A un barbotage d'un mélange gazeux contenant 5% de CO₂ est réalisé durant environ 20 min afin que la pression partielle en CO₂ dissous soit à l'équilibre avec la pression partielle de CO₂ dans ce mélange. La pression partielle en CO₂ dissous dans la bouteille B est supposée à l'équilibre avec la pression partielle CO₂ dans l'air ambiant. Un échelon positif de concentration en CO₂ dissous est réalisé en déplaçant la sonde de la bouteille A à la bouteille B. De même un échelon négatif de concentration en CO₂ dissous est réalisé en déplaçant la sonde de la bouteille B à la bouteille A. Le changement de bouteille prend environ 2 s et est donc négligeable devant la dynamique de réponse de la sonde. Trois échelons positifs et trois échelons négatifs sont réalisés afin d'estimer la reproductibilité des mesures.

La réponse dynamique de la sonde à un échelon de concentration en CO₂ dissous réalisé au temps t_0 est assimilée à la réponse indicielle d'un système du premier ordre avec prise en compte d'un retard pur (Bloemen et al., 2003; Nocentini et al., 1993)

$$x(t) = x_{final} + (x_{initial} - x_{final}) \times \exp\left(-\frac{(t-R)}{\tau}\right) \quad \text{Equation 89}$$

Avec $x_{initial}$ Pression partielle en CO₂ dissous à l'instant initial (%)
 x_{finale} Pression partielle en CO₂ dissous à l'instant final (%)
 τ Constante de temps (s)
 R Retard pur (s)

Cette réponse est ajustée aux données expérimentales par une méthode de minimisation de l'erreur entre le modèle et les données suivant le critère des moindres carrés (Taymaz-Nikerel et al., 2011). Les paramètres utilisés pour réaliser cet ajustement sont la constante de temps τ , la

concentration finale x_{finale} et le retard pur R . Les résultats obtenus pour la sonde InPro5000 sont détaillées dans le Tableau 33. La réponse dynamique de la sonde InPro5000 est donc plus lente que prévu par le constructeur. De plus, la réponse dynamique apparaît nettement plus rapide en échelon négatif qu'en échelon positif.

Tableau 33. Résultats de l'estimation paramétrique réalisée sur la réponse impulsionnelle de la sonde InPro 5000.

Paramètre	Echelons négatifs	Échelons positifs
Retard pur R (s)	9.1 ± 2.5	99.0 ± 6.5
Constante de temps (s)	148.9 ± 4.2	209.0 ± 3.4

Une démarche similaire conduit à l'identification des constantes de temps caractéristiques de la réponse dynamique de la sonde YSI8500 : 124s en échelon négatif et 126 s en échelon positif ce qui est proche des spécifications du constructeur.

La concentration mesurée par un capteur à CO_2 dissous est donc corrigé pour tenir compte de la réponse dynamique de ce capteur (Equation 89).

$$x_{\text{corrigée}}(t) = x_{\text{mesurée}}(t - R) - \frac{d(x_{\text{mesurée}})}{dt} \cdot \tau \quad \text{Equation 90}$$

2.3.7 Analyse des gaz

La composition des gaz d'entrée et de sortie est mesurée avec un analyseur URAS-8 (B-Braun, Allemagne) pour les cultures discontinues alimentées. La mesure de la fraction en oxygène est réalisée par une méthode polarographique et la mesure de la fraction en dioxyde de carbone par absorption infra-rouge. Les données sont enregistrées toutes les 30s.

La composition des gaz d'entrée et de sortie est mesurée avec un spectromètre de masse Prima600s (Thermofisher, Royaume-Uni). Les données sont enregistrées toutes les 10s.

2.3.8 Dispositif d'enrichissement en CO_2

L'enrichissement en CO_2 est assuré par l'utilisation détournée du débitmètre massique O_2 qui a été calibré avec de l'air par le constructeur (Figure 19).

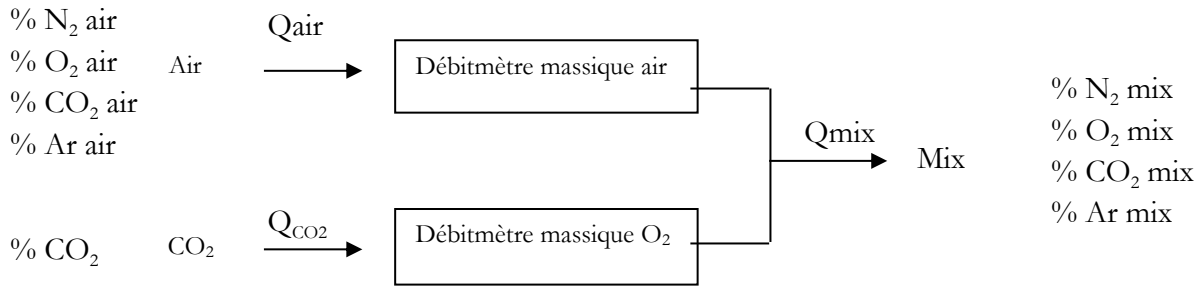


Figure 19. Dispositif d'enrichissement en CO₂ du mélange gazeux d'entrée.

Le débit de CO₂ est calculé à partir de la consigne imposée au débitmètre O₂ en tenant compte des différences entre les capacités calorifiques et les densités de l'air et du CO₂ (Equation 91). La validité

$$Q_{CO_2}^{reel} = \frac{C_p^{air} \times d_{0^\circ C}^{air}}{C_p^{CO_2} \times d_{0^\circ C}^{CO_2}} \cdot Q_{O_2}^{consigne} \quad \text{Equation 91}$$

La composition du mélange gazeux peut donc être recalculée à partir de la connaissance des débits d'air et de CO₂ et de leur composition.

2.4 Traitement des résultats

2.4.1 Traitement des gaz

2.4.1.1 Définition du système considéré

Le système considéré pour l'analyse des gaz est représenté sur la Figure 20.

En culture batch les débits liquides d'entrée et de sortie sont nuls. En culture fed-batch le débit liquide de sortie est nul. En culture continue le débit d'entrée est connu à tout moment car la masse du bidon d'alimentation est mesurée en ligne et la densité de la solution d'alimentation est connue.

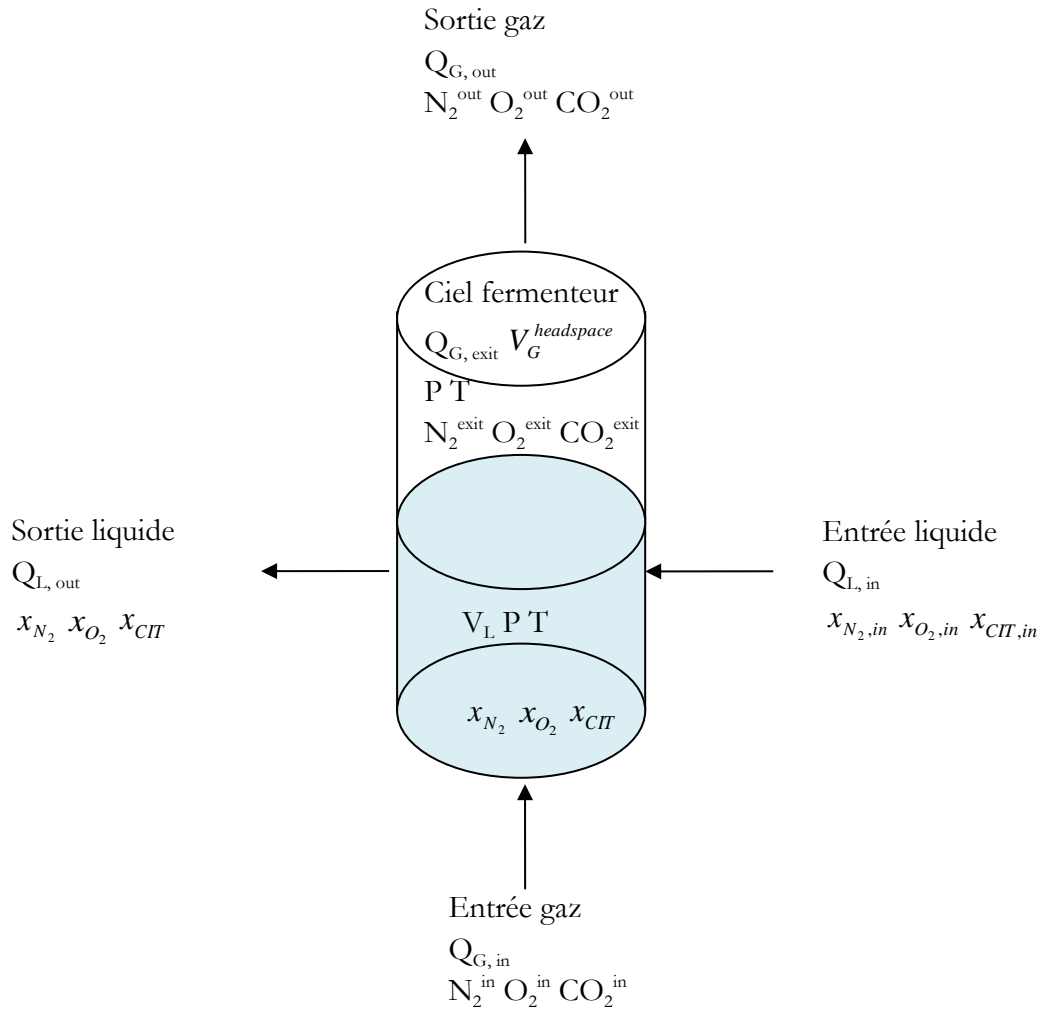


Figure 20. Schéma du système considéré pour le traitement des gaz.

Avec	P	Pression absolue (Pa)
	T	Température (K)
	$Q_{L, in}$	Débit liquide d'alimentation (L.h ⁻¹)
	$Q_{L, out}$	Débit liquide de sortie (L.h ⁻¹)
	$Q_{G, in}$	Débit de ventilation (mole.h ⁻¹)
	$Q_{G, out}$	Débit gazeux de sortie (mole.h ⁻¹)
	V_L	Volume de phase liquide (L)
	$V_G^{headspace}$	Volume de phase gaz (mole)
	A^{in}	Fraction molaire du composé A dans les gaz d'entrée
	A^{exit}	Fraction molaire du composé A dans les gaz à la sortie de la phase liquide
	A^{out}	Fraction molaire du composé A dans les gaz de sortie du réacteur
	x_A	Concentration du composé A dans la phase liquide
	$x_{A, in}$	Concentration du composé A dans les solutions d'alimentation

Le volume de ciel gazeux est calculé par l'Equation 83 à partir du volume molaire $V_{m,0}$ d'un gaz parfait considéré à une température de référence T_0 de 273.15 K et à une pression de référence P_0 de 101325 Pa.

$$V_G^{Headspace} = \frac{V_T - V_L}{V_{m,0} \cdot \frac{T}{T_{ref}} \cdot \frac{P_{ref}}{P}} \quad \text{Equation 92}$$

Avec	V_T	Volume total du réacteur (L)
	V_L	Volume de la phase liquide (L)
	$V_{m,0}$	Volume molaire à P_0 et T_0 (L.mole ⁻¹)
	P_{ref}	Pression de référence (Pa).
	T_{ref}	Température de référence (K)

2.4.1.2 Calcul du débit gazeux de sortie

Le débit gazeux de sortie $Q_{G, out}$ est calculé à partir du bilan de matière du diazote sur la phase liquide (Equation 93).

$$\frac{d(x_{N_2} \cdot V_L)}{dt} = r_{N_2, L} \cdot V_L + \phi_{N_2} \cdot V_L \quad \text{Equation 93}$$

Avec ϕ_{N_2} flux net d'échange du diazote (mole.L⁻¹.h⁻¹)

$r_{N_2, L}$ Vitesse de production ou consommation du diazote en phase liquide (mole.L⁻¹.h⁻¹)

Le diazote est faiblement soluble en phase liquide donc le terme dérivé peut être négligé et le diazote n'est pas produit ou consommé par la biomasse donc le terme de réaction est nul.

L'Equation 94 est alors équivalente à l'Equation 93.

$$\phi_{N_2} \cdot V_L = Q_{G, in} \cdot N_2^{in} - Q_{G, out} \cdot N_2^{exit} = 0 \quad \text{Equation 94}$$

Soit,

$$N_2^{exit} = \frac{Q_{G, in} \cdot N_2^{in}}{Q_{G, out}} \quad \text{Equation 95}$$

Le bilan de matière du diazote sur le ciel gazeux est donné par l'Equation 96.

$$\frac{d(N_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt} = Q_{G, out} \cdot (N_2^{out} - N_2^{exit}) \quad \text{Equation 96}$$

En combinant l'Equation 95 et l'Equation 96 il est possible de calculer le débit de sortie (Equation 97).

$$Q_{G, out} = \frac{Q_{G, in} \cdot N_2^{in} - \frac{d(N_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt}}{N_2^{out}} \quad \text{Equation 97}$$

2.4.1.3 Calcul de la vitesse de consommation d'oxygène

Le bilan de matière du dioxygène sur le système considéré est donné par l'Equation 98.

$$\frac{d(x_{O_2} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(O_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt} = Q_{G,in} \cdot O_2^{in} - Q_{G,out} \cdot O_2^{out} + Q_{L,in} \cdot x_{O_2,in} - Q_{L,out} \cdot x_{O_2} + r_{O_2,L} \cdot V_L$$

Equation 98

La vitesse volumique relative à l'oxygène est alors directement calculable par l'Equation 99.

$$\frac{d(x_{O_2} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(O_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt} - Q_{G,in} \cdot O_2^{in} + Q_{G,out} \cdot O_2^{out}$$

$$r_{O_2,L} = \frac{-Q_{L,in} \cdot x_{O_2,in} + Q_{L,out} \cdot x_{O_2}}{V_L}$$

Equation 99

La concentration en oxygène dissous x_{O_2} est calculée d'après la mesure de la pression partielle en oxygène dissous qui est définie par rapport à la concentration de saturation avec l'air dans les conditions de pression et de travail de la culture (Equation 100). En effet l'influence de la température et de la composition du milieu sur la valeur de la constante de Henry H_{O_2} est prise en compte (annexe 1).

$$x_{O_2} = \frac{dO_2}{100} \cdot x_{O_2}^* \cdot \frac{P}{P_{ref}} = \frac{dO_2}{100} \cdot y_{O_2} \cdot R.T.H_{O_2} \cdot \frac{P}{P_{ref}}$$

Equation 100

Les performances de transfert liquide-gaz de l'oxygène peuvent être identifiées à partir du bilan de matière de l'oxygène sur la phase liquide (Equation 101).

$$\frac{d(x_{O_2} \cdot V_L)}{dt} = \Phi_{O_2} \cdot V_L + Q_{L,in} \cdot x_{O_2,in} - Q_{L,out} \cdot x_{O_2} + r_{O_2,L} \cdot V_L$$

Equation 101

Avec Φ_{O_2} Flux net de transfert gaz / liquide de l'oxygène (mole.L⁻¹.h⁻¹)

Le flux de transfert liquide / gaz de l'oxygène peut être exprimé par l'Equation 37 et par l'Equation 102.

$$\Phi_{O_2} \cdot V_L = Q_{G,in} \cdot O_2^{in} - Q_{G,out} \cdot O_2^{exit}$$

Equation 102

La fraction molaire en O_2 à la sortie de la phase liquide peut être calculée à partir du bilan de matière de l' O_2 sur le ciel gazeux (Equation 103).

$$O_{2,exit} = \frac{\frac{d(O_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt} + Q_{G,out} \cdot O_{2,out}}{Q_{G,out}}$$

Equation 103

Le coefficient volumique de transfert gaz / liquide de l'oxygène peut alors être calculé par l'Equation 104.

$$K_L a(O_2) = \frac{Q_{G,in} \cdot O_2^{in} - Q_{G,out} \cdot O_2^{exit}}{V_L \cdot (x_{O_2}^* - x_{O_2})}$$

Equation 104

Dans le cas d'un écoulement de type piston de la phase gaz le gradient de transfert gaz/liquide de l'oxygène est calculé par l'Equation 105. D'après la loi des gaz parfaits l'Equation 105 peut aussi être exprimée sous la forme de l'Equation 106.

$$(x_{O_2}^* - x_{O_2})_{lm} = \frac{P.H_{O_2} \cdot (O_2^{in} - O_2^{exit})}{\ln \left(\frac{P.H_{O_2} \cdot O_2^{in} - x_{O_2}}{P.H_{O_2} \cdot O_2^{exit} - x_{O_2}} \right)} \quad \text{Equation 105}$$

$$(x_{O_2}^* - x_{O_2})_{lm} = \frac{(y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^{exit})}{\ln \left(\frac{y_{O_2}^{in} - y_{O_2}^*}{y_{O_2}^{exit} - y_{O_2}^*} \right)} \cdot RTH_{O_2} \quad \text{Equation 106}$$

2.4.1.4 Calcul de la vitesse de production de dioxyde de carbone

Le dioxyde de carbone est impliqué dans des équilibres dynamiques avec les ions hydrogénocarbonates et carbonates (chapitre 1.3.3). Ces équilibres dynamiques doivent être considérés dans le calcul de la vitesse de production du CO_2 .

D'après les équations de prédominance des formes (Equation 19, Equation 20, Equation 21) la concentration en carbone inorganique total CIT peut être calculée à partir de la connaissance de la concentration en dioxyde de carbone dissous par l'Equation 107.

$$x_{CIT} = x_{CO_2} \cdot \left(1 + \frac{K_1}{x_{H^+}} + \frac{K_1 \cdot K_2}{x_{H^+}^2} \right) \quad \text{Equation 107}$$

La concentration en dioxyde de carbone dissous x_{CO_2} est calculée d'après la mesure de la pression partielle à dioxyde de carbone dissous qui est définie par rapport à la concentration de saturation par rapport à un gaz étalon dans les conditions de pression et de travail de la culture (Equation 100). En effet l'influence de la température et de la composition du milieu sur la valeur de la constante de Henry H_{CO_2} est prise en compte (annexe 1).

$$x_{CO_2} = \frac{dCO_2}{100} \cdot x_{CO_2}^* \cdot \frac{P}{P_{ref}} = \frac{dCO_2}{100} \cdot y_{CO_2} \cdot R.T.H_{CO_2} \cdot \frac{P}{P_{ref}} \quad \text{Equation 108}$$

Le bilan de matière du dioxyde de carbone sur le système considéré est alors donné par l'Equation 109.

$$\frac{d(x_{CIT} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(CO_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt} = Q_{G,in} \cdot CO_2^{in} - Q_{G,out} \cdot CO_2^{out} + Q_{L,in} \cdot x_{CIT,in} - Q_{L,out} \cdot x_{CIT} + r_{CO_2,L} \cdot V_L \quad \text{Equation 109}$$

La vitesse volumique relative au dioxyde de carbone est alors directement calculable par l'Equation 110.

$$\begin{aligned} & \frac{d(x_{CIT}.V_L)}{dt} + \frac{d(CO_2.V_G^{Headspace})}{dt} - Q_{G,in}.CO_2^{in} \\ & + Q_{G,out}.CO_2^{out} \\ r_{CO_2,L} = & \frac{-Q_{L,in}.x_{CIT,in} + Q_{L,out}.x_{CIT}}{V_L} \end{aligned} \quad \text{Equation 110}$$

Les performances de transfert gaz / liquide du dioxyde de carbone peuvent être identifiées à partir du bilan de matière de l'oxygène sur la phase liquide (Equation 111).

$$\frac{d(x_{CIT}.V_L)}{dt} = \Phi_{CO_2}.V_L + Q_{L,in}.x_{CIT,in} - Q_{L,out}.x_{CIT} + r_{CO_2,L}.V_L \quad \text{Equation 111}$$

Avec Φ_{O_2} Flux net de transfert liquide / gaz du dioxyde de carbone (mole.L⁻¹.h⁻¹)

Le flux de transfert liquide / gaz de l'oxygène peut être exprimé par l'Equation 37 et par l'Equation 112.

$$\Phi_{CO_2}.V_L = Q_{G,in}.CO_2^{in} - Q_{G,out}.CO_2^{exit} \quad \text{Equation 112}$$

La fraction molaire en CO₂ à la sortie de la phase liquide peut être calculée à partir du bilan de matière du CO₂ sur le ciel gazeux (Equation 113).

$$CO_{2,exit} = \frac{\frac{d(CO_2.V_G^{Headspace})}{dt} + Q_{G,out}.CO_{2,out}}{Q_{G,out}} \quad \text{Equation 113}$$

Le coefficient volumique de transfert gaz / liquide du dioxyde de carbone peut alors être calculé par l'Equation 114.

$$K_L a(CO_2) = \frac{Q_{G,in}.CO_2^{in} - Q_{G,out}.CO_2^{exit}}{V_L.(x_{CO_2} - x_{CO_2}^*)} \quad \text{Equation 114}$$

Dans le cas d'un écoulement de type piston de la phase gaz le gradient de transfert gaz/liquide du dioxyde de carbone est calculé par l'Equation 115. D'après la loi des gaz parfaits l'Equation 105 peut aussi être exprimée sous la forme de l'Equation 116.

$$(x_{CO_2} - x_{CO_2}^*)_{lm} = \frac{P.H_{CO_2}.(CO_2^{exit} - CO_2^{in})}{\ln\left(\frac{P.H_{CO_2}.CO_2^{exit} - x_{CO_2}}{P.H_{CO_2}.CO_2^{in} - x_{CO_2}}\right)} \quad \text{Equation 115}$$

$$(x_{CO_2} - x_{CO_2}^*)_{lm} = \frac{(y_{CO_2}^{exit} - y_{CO_2}^{in})}{\ln\left(\frac{y_{CO_2}^{exit} - y_{CO_2}^*}{y_{CO_2}^{in} - y_{CO_2}^*}\right)} RTH_{CO_2} \quad \text{Equation 116}$$

2.4.1.5 Calcul du coefficient respiratoire

Le coefficient respiratoire RQ est calculé par l'Equation 117.

$$RQ = \frac{r_{CO_2}}{r_{O_2}} \quad \text{Equation 117}$$

2.4.2 Calcul des vitesses pour les composés en solution

Le système considéré pour le calcul de la vitesse relative à un composé A en solution est représenté sur la Figure 21.

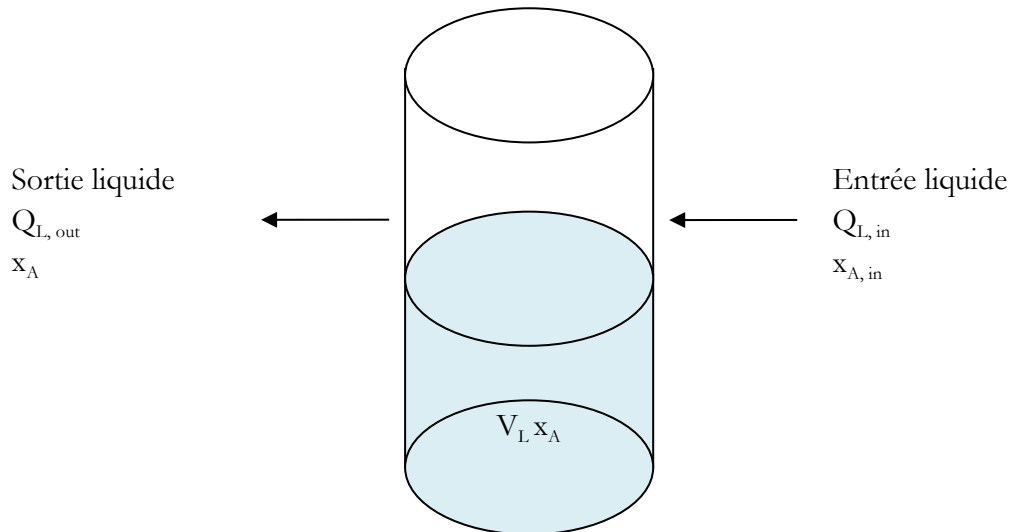


Figure 21. Schéma du système considéré pour le traitement des gaz.

Avec

$Q_{L,in}$	Débit liquide d'alimentation (L.h ⁻¹)
$Q_{L,out}$	Débit liquide de sortie (L.h ⁻¹)
V_L	Volume de phase liquide (L)
x_A	Concentration du composé A dans la phase liquide
$x_{A,in}$	Concentration du composé A dans les solutions d'alimentation

Le bilan de matière du composé A sur la phase liquide est décrit par l'Equation 118.

$$\frac{d(x_A \cdot V_L)}{dt} = Q_{L,in} \cdot x_{A,in} - Q_{L,out} \cdot x_A + r_A \cdot V_L \quad \text{Equation 118}$$

La vitesse relative au composé A est donc obtenue par l'Equation 119.

$$r_A = \frac{\frac{d(x_A \cdot V_L)}{dt} - Q_{L,in} \cdot x_{A,in} + Q_{L,out} \cdot x_A}{V_L} \quad \text{Equation 119}$$

La vitesse spécifique relative au composé A est obtenue par l'Equation 120.

$$q_A = \frac{r_A}{X} \quad \text{Equation 120}$$

2.4.3 Lissage et réconciliation des données

Les données obtenues en culture discontinue alimentée pour les différentes variables sont converties en masse cumulée ce qui permet de s'affranchir des variations de volume au cours de la culture. Les vitesses obtenues en chemostat et accélérostat sont directement utilisées pour le lissage et la réconciliation.

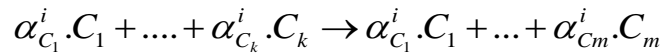
Les données sont traitées avec le logiciel LIREC développé au laboratoire et qui permet de lisser puis de réconcilier les données. Le lissage des données est effectué par une interpolation des données par des polynômes sur une fenêtre glissante selon la méthode des splines cubiques. Le lissage d'une variable permet d'obtenir une continuité de la variable et de sa dérivée première.

Les données lissées sont ensuite réconciliées selon la méthode définie par (van der Heijden et al., 1994). La vérification des bilans élémentaires permet de détecter d'éventuelles anomalies des bilans de matière et, si le système le permet, d'estimer la valeur des vitesses réactionnelles permettant de boucler ces bilans. L'intégration d'une vitesse réconciliée permet alors d'accéder aux valeurs réconciliées d'une variable.

2.4.4 Bilans molaires et élémentaires

2.4.4.1 Généralités

Soit le cas d'un système réactionnel composé de n réactions n_i où interviennent m composés C_j comme décrit pour la réaction i :



Le vecteur \vec{r}_{net} décrivant les vitesses nettes de réaction pour chaque composé C_j est alors obtenu par le produit du vecteur \vec{r} décrivant les vitesses de réaction et de la matrice stoechiométrique décrivant les coefficients stoechiométriques des composés C_j impliqués dans les réactions n_i (Equation 121)

$$\vec{r}_{net} = \vec{r} \cdot |M| \quad \text{Equation 121}$$

Avec la matrice stoechiométrique M définie par l'Equation 122.

$$|M| = \begin{bmatrix} \alpha_{C_1}^1 & \alpha_{C_2}^1 & \dots & \alpha_{C_m}^1 \\ \alpha_{C_1}^2 & \alpha_{C_2}^2 & \dots & \alpha_{C_m}^2 \\ \vdots & \vdots & \ddots & \vdots \\ \alpha_{C_1}^i & \alpha_{C_2}^i & \dots & \alpha_{C_m}^i \end{bmatrix} \quad \text{Equation 122}$$

L'évolution du vecteur \vec{C} décrivant les concentrations molaires des composés C_j est alors obtenue par l'Equation 123.

$$\frac{d(\vec{C})}{dt} = \vec{r} \cdot |M| + \vec{\varphi} \quad \text{Equation 123}$$

Avec $\bar{\phi}$ Flux net d'échange des composés avec l'extérieur du système (mole.L⁻¹.h⁻¹)

Soit la matrice élémentaire E décrivant la composition élémentaire des k éléments E_p composant les composés C_j.

$$|E| = \begin{vmatrix} \varepsilon_{C_1}^1 & \varepsilon_{C_1}^2 & \cdot & \varepsilon_{C_1}^k \\ \varepsilon_{C_2}^1 & \varepsilon_{C_2}^2 & \cdot & \varepsilon_{C_2}^k \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \varepsilon_{C_m}^1 & \varepsilon_{C_m}^2 & \cdot & \varepsilon_{C_m}^k \end{vmatrix} \quad \text{Equation 124}$$

L'Equation 123 présentant le bilan molaire pour les composés du système devient alors l'Equation 125.

$$\frac{d(\bar{C} \cdot |E|)}{dt} = \bar{r} \cdot |M| \cdot |E| + \bar{\phi} \cdot |E| \quad \text{Equation 125}$$

Avec

$$\frac{d(\bar{C} \cdot |E|)}{dt} \quad \text{Flux d'accumulation de la concentration des k éléments E}_p \text{ (mole.h}^{-1}\text{)}$$

$$\bar{r} \cdot |M| \cdot |E| \quad \text{Vitesses nettes de conversion des k éléments E}_p \text{ (mole.h}^{-1}\text{)}$$

$$\bar{\phi} \cdot |E| \quad \text{Flux d'échange des k éléments E}_p \text{ avec l'extérieur du système (mole.h}^{-1}\text{)}$$

Dans le cas d'un système biologique seuls les éléments C, H, O, N et parfois P et S sont considérés et la matrice élémentaire peut alors être décrite par l'Equation 126. De plus, les concentrations sont ramenées à une mole de Carbone et exprimées en C.mole.L⁻¹ et la matrice élémentaire est alors calculée par l'Equation 127.

$$|E| = \begin{vmatrix} \varepsilon_{C_1}^C & \varepsilon_{C_1}^H & \varepsilon_{C_1}^O & \varepsilon_{C_1}^N \\ \varepsilon_{C_2}^C & \varepsilon_{C_2}^H & \varepsilon_{C_2}^O & \varepsilon_{C_2}^N \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ \varepsilon_{C_m}^C & \varepsilon_{C_m}^H & \varepsilon_{C_m}^O & \varepsilon_{C_m}^N \end{vmatrix} \quad \text{Equation 126}$$

$$|E| = \begin{vmatrix} 1 & \varepsilon_{C_1}^H & \varepsilon_{C_1}^O & \varepsilon_{C_1}^N \\ 1 & \varepsilon_{C_2}^H & \varepsilon_{C_2}^O & \varepsilon_{C_2}^N \\ \cdot & \cdot & \cdot & \cdot \\ 1 & \varepsilon_{C_m}^H & \varepsilon_{C_m}^O & \varepsilon_{C_m}^N \end{vmatrix} \quad \text{Equation 127}$$

Dans le cas d'un système biologique les vitesses nettes de conversion des éléments sont nulles soit $\bar{r} \cdot |M| \cdot |E| = 0$. Il est alors possible de raisonner sur les vitesses de conversion pour une analyse instantanée ou d'intégrer ces vitesses sur un intervalle de temps.

Les composés considérés dans le système sont présentés dans le Tableau 34

Tableau 34. Composés considérés dans le calcul des bilans.

Composé	Composition élémentaire	M (g.Cmole ⁻¹)	Degré de réduction généralisé
Glucose	CH ₂ O	30	4
Ethanol	CH ₃ O _{0.5}	23	6
Biomasse	CH _{1.789} O _{0.531} N _{0.160}	25.86	4.21
Acétate	CH ₂ O	30	4
Glycérol	CH _{2.67} O	30.7	4.67
Succinate	CH _{1.5} O	29.5	3.5
CO ₂	CO ₂	44	0
O ₂	O ₂	32	-4
H ₂ O	H ₂ O	18	0

2.4.4.2 Bilan carbone

Le bilan carbone (Equation 128) est obtenu pour les composés dont le coefficient élémentaire est 1 pour l'élément carbone dans la matrice élémentaire de notre système.

$$r_{CO_2} + r_{glucose} + r_{ethanol} + r_{acetate} + r_{glycerol} + r_{succinate} + r_X = 0 \quad \text{Equation 128}$$

2.4.4.3 Bilan redox

Certaines variables du système ne sont pas mesurées (eau, source d'azote) mais il est alors possible d'effectuer un bilan élémentaire global. Pour cela chacune des équations du système est multiplié par un facteur λ_p propre à chaque élément E_p (Equation 129)

$$\lambda_p \cdot r_1 \cdot \mathcal{E}_{C_1}^p + \lambda_p \cdot r_2 \cdot \mathcal{E}_{C_2}^p + \dots + \lambda_p \cdot r_m \cdot \mathcal{E}_{C_m}^p \quad \text{Equation 129}$$

En sommant sur les k éléments du système on obtient l'Equation 130.

$$\sum_{p=1}^k (\lambda_p \cdot r_1 \cdot \mathcal{E}_{C_1}^p + \lambda_p \cdot r_2 \cdot \mathcal{E}_{C_2}^p + \dots + \lambda_p \cdot r_m \cdot \mathcal{E}_{C_m}^p) = 0 \quad \text{Equation 130}$$

Le degré de réduction généralisé γ_j d'un composé C_j est calculé par l'Equation 131.

$$\gamma_j = \sum_{p=1}^k (\lambda_p \cdot \mathcal{E}_{C_1}^p) \quad \text{Equation 131}$$

L'Equation 130 peut alors s'écrire sous la forme de l'Equation 132.

$$\sum_{j=1}^m (\gamma_j \cdot C_j) = 0 \quad \text{Equation 132}$$

Ainsi il est possible d'éliminer du bilan élémentaire global un composé dont l'évolution est inconnue par l'annulation de son degré de réduction généralisé. Les paramètres choisis sont $\lambda_C = 4$, $\lambda_H = 1$, $\lambda_{H^+} = -2$ et $\lambda_N = -3$ afin d'éliminer l'eau, le CO_2 et la source d'azote.

Le bilan élémentaire global du système est alors décrit par l'Equation 133.

$$\begin{aligned} \gamma_{O_2} \cdot r_{O_2} + \gamma_{glucose} \cdot r_{glucose} + \gamma_{ethanol} \cdot r_{ethanol} + \gamma_{acetate} \cdot r_{acetate} \\ + \gamma_{glycerol} \cdot r_{glycerol} + \gamma_{succinate} \cdot r_{succinate} + \gamma_X \cdot r_X = 0 \end{aligned} \quad \text{Equation 133}$$

2.4.5 Modélisation métabolique

Le calcul des flux métaboliques intracellulaires est réalisé par l'utilisation d'un modèle de type M.F.A (Metabolic Flux Analysis) développé au laboratoire pour la levure *S. cerevisiae* par Carine Bideaux (Bideaux, 2000). La compartimentation a été ajoutée à ce modèle par Julien Pagliardini (Pagliardini, 2010).

Le modèle prend en compte des composés qui peuvent être classés en substrats, produits du métabolisme, intermédiaires intracellulaires du métabolisme et la biomasse. Il comprend également 128 réactions qui sont présentées dans l'annexe 5.

Pour chaque composé un bilan de matière est réalisé (Equation 134) décrivant l'évolution de la concentration d'un composé comme la résultante des k réactions de consommation, des p réactions de production et des phénomènes de transport impliquant ce composé (entre les compartiments, entre la cellule et le milieu extérieur).

$$\frac{d(C_A \cdot X)}{dt} = \sum_{i=1}^l -\beta_A^i \cdot r_i \cdot X + \sum_{j=1}^k +\beta_A^j \cdot r_j \cdot X + \bar{\varphi}_A \cdot X \quad \text{Equation 134}$$

Avec $\bar{\varphi}_A$ Flux d'échange du composé entre la biomasse et le milieu ($\text{mole.g}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)
 C_A Concentration intracellulaire du composé A (mole.g_X^{-1})

L'Equation 135 est alors équivalente à l'Equation 134.

$$\frac{d(C_A)}{dt} = \sum_{i=1}^k -\beta_A^i \cdot r_i \cdot X + \sum_{j=1}^p +\beta_A^j \cdot r_j \cdot X + \bar{\varphi}_A \cdot X - \mu \cdot C_A \quad \text{Equation 135}$$

Il est considéré que le système est en régime permanent dans la mesure où les constantes de temps caractérisant les réactions intracellulaires (10^{-4} s) sont beaucoup plus faibles que celles caractérisant la croissance cellulaire et / ou les phénomènes de mélange et de transfert (10^1 à 10^4 s). De plus, le terme de dilution dans la biomasse $\mu \cdot C_A$ peut être négligé au vu des faibles concentrations intracellulaires des intermédiaires métaboliques.

Ainsi pour chaque composé l'Equation 136 est obtenue à partir de l'Equation 135 et décrit le calcul du flux net de ce composé sur l'ensemble des n réactions. Le flux net R_A est nul pour les composés intracellulaires.

$$R_A = \sum_{i=1}^n \beta_A^i \cdot r_A^i \quad \text{Equation 136}$$

Avec R Flux net pour le composé r (mole.h⁻¹)

r_A^i Vitesse de la réaction i (mole.h⁻¹)

β_A^i Coefficient stoechiométrique du composé A dans la réaction i (-)

En prenant en compte l'ensemble des n réactions impliquant les m composés dont k sont échangés avec le milieu extérieur, on obtient le système matriciel décrit par l'Equation 137. Les inconnues sont les vitesses de réaction r et les flux d'échanges R .

$$S \cdot r = R \quad \text{Equation 137}$$

Avec S Matrice stoechiométrique de dimension (m, n)

r Vecteur des vitesses de réaction de dimension ($n, 1$)

R Vecteur des vitesses nettes pour les m composés de dimension ($m, 1$)

Soit,

$$\begin{bmatrix} \beta_1^1 & \cdot & \beta_n^1 \\ \cdot & \cdot & \cdot \\ \beta_1^m & \cdot & \beta_n^m \end{bmatrix} \begin{bmatrix} r_1 \\ \cdot \\ r_n \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} R_1 \\ \cdot \\ R_1 \\ 0 \\ \cdot \\ R_1 \end{bmatrix} \quad \text{Equation 138}$$

Le système matriciel est sous déterminé dans la mesure où le nombre d'inconnus ($m + k$) est supérieur au nombre d'équations n . Le système possède alors une infinité de solution. La résolution pour l'obtention d'une solution unique nécessite de disposer d'un nombre de vitesses nettes égal au degré d'indetermination. Les flux intracellulaires n'étant pas mesurés, les vitesses nettes utilisées pour la résolution du système correspondent aux vitesses nettes mesurées de composés impliquées dans des échanges entre la cellule et le milieu intracellulaire. Ces valeurs de flux doivent cependant être non redondantes pour pouvoir être utilisés dans la résolution.

3. Etude du transfert croisé O_2 / CO_2 en conditions de culture microbienne intensive

3.1 Introduction

Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article scientifique soumis pour publication dans le journal « Bioprocess and Biosystems Engineering ».

Le transfert liquide / gaz du dioxyde de carbone est classiquement décrit par analogie avec le transfert gaz / liquide de l'oxygène (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977). Cependant plusieurs études expérimentales remettent en cause cette relation canonique (Dahod, 1993; Gray et al., 1996; Hiltbrunner and Zizek, 2006; Puskeiler et al., 2012; Sherstobitova and Bylinkina, 1977; Sieblis et al., 2011; Smith and Ho, 1985). Il y a donc une contradiction entre la relation théorique et les données expérimentales rapportées dans la littérature.

La connaissance de la dynamique de désorption du CO_2 des moûts de fermentation est importante car une désorption lente du CO_2 des moûts de fermentation pourrait entraîner une accumulation du CO_2 en phase liquide. Il serait alors possible d'atteindre des concentrations de l'ordre de grandeur de celles pouvant affecter le métabolisme cellulaire.

La démarche adoptée consiste à étudier le transfert liquide / gaz du CO_2 lors d'une culture microbienne intensive c'est-à-dire une culture où les vitesses de consommation d' O_2 et de production de CO_2 atteintes sont importantes et nécessitent l'application de puissances dissipées élevées (Fyferling et al., 2008; Knoll et al., 2007; Schaepe et al., 2013). Une telle approche permet de mettre à jour les interactions entre phénomènes biologiques et phénomènes de transfert.

Dans un premier temps, le transfert croisé O_2 / CO_2 lors de l'ascension d'une bulle dans le réacteur est investigué par le biais d'un modèle de transfert de matière. Ensuite, les résultats obtenus lors d'une culture discontinue alimentée limitée en glucose de la levure *S. cerevisiae* sont présentés avec notamment une description de l'évolution des coefficients volumiques globaux de transfert de l'oxygène de l' O_2 et du CO_2 au cours de la culture. Enfin, les résultats sont discutés par rapport à la littérature et une explication originale aux phénomènes observés est proposée.

3.2 Développement des modèles

Deux modèles ont été développés dans le cadre de l'étude du transfert croisé O_2 / CO_2 en réacteur agité aéré. Le premier modèle décrit le transfert croisé gaz / liquide de l'oxygène et liquide / gaz du dioxyde de carbone lors de l'ascension d'une bulle dans un fermenteur. Il est utilisé pour obtenir les résultats décrits dans la partie 3.3.4.1 de la publication. Le second modèle caractérise une distribution de tailles de bulles dans un réacteur. Il est utilisé en association avec le premier modèle pour obtenir les résultats décrits dans les parties 3.3.5.1 et 3.3.5.2 de la publication. La démarche adoptée est résumée sur la Figure 22.

3.2.1 O₂ and CO₂ mass transfer model

The model used to describe O₂ and CO₂ mass transfer from and to a gas phase of volume V_G is described in this section. O₂ and CO₂ mass balances on ascending air bubbles and diffusion equations were used to describe the evolution of O₂ and CO₂ gaseous partial pressures as well as the evolution of the mole amount in a bubble during an aerobic microbial culture.

The O₂ and CO₂ mole fraction in the gas volume V_G is described by Equation 139 and Equation 140 respectively.

$$n_{O_2} = \frac{moles_{O_2}}{moles_{total}} \quad \text{Equation 139}$$

$$n_{CO_2} = \frac{moles_{CO_2}}{moles_{total}} \quad \text{Equation 140}$$

Consequently,

$$\frac{dmoles_{O_2}}{dt} = \frac{dn_{O_2}}{dt} \cdot moles_{total} + \frac{dmoles_{total}}{dt} \cdot n_{O_2} = \Phi_{O_2} \quad \text{Equation 141}$$

And

$$\frac{dmoles_{CO_2}}{dt} = \frac{dn_{CO_2}}{dt} \cdot moles_{total} + \frac{dmoles_{total}}{dt} \cdot n_{CO_2} = \Phi_{CO_2} \quad \text{Equation 142}$$

As

$$\frac{dmoles_{total}}{dt} = \frac{dmoles_{CO_2}}{dt} + \frac{dmoles_{O_2}}{dt} = \Phi_{CO_2} + \Phi_{O_2} \quad \text{Equation 143}$$

One's yields that

$$\frac{dn_{CO_2}}{dt} = \frac{1}{moles_{total}} (\Phi_{CO_2} \cdot (1 - n_{CO_2}) + \Phi_{O_2} \cdot n_{CO_2}) \quad \text{Equation 144}$$

And

$$\frac{dn_{O_2}}{dt} = \frac{1}{moles_{total}} (\Phi_{O_2} \cdot (1 - n_{O_2}) + \Phi_{CO_2} \cdot n_{O_2}) \quad \text{Equation 145}$$

The CO₂ mass transfer flux from the liquid phase to a gas bubble Φ_{CO_2} was described using the Fick's law in the liquid film around the gas bubbles (Equation 146). Similar calculations were used to calculate the O₂ mass transfer from a gas bubble Φ_{O_2} (not shown). Fick's law was used as the overall fluxes of O₂ and CO₂ were roughly equimolar throughout the culture (respiratory coefficient close to 1). If the O₂ and CO₂ fluxes had not been equimolar, one should have used Maxwell-Stephan equation as described in (Krishna and Wesselingh, 1997).

$$\vec{J}_{CO_2} = -D_{CO_2} \times \vec{\nabla} x_{CO_2} \quad \text{Equation 146}$$

The mass balance on the gas bubble yields Equation 147 and Equation 148.

$$\iiint_V \frac{\partial x_{CO_2}}{\partial t} dV = - \iint_S \vec{J}_{CO_2} dS \quad \text{Equation 147}$$

$$\iiint_V \frac{\partial x_{CO_2}}{\partial t} dV = - \iiint_V \text{div}(\vec{J}_{CO_2}) dV \quad \text{Equation 148}$$

Under steady state conditions and considering a one-direction space one's yields Equation 149, Equation 150 and Equation 151. Bubbles are assumed to be spherical (Machon et al., 1997).

$$\text{div}(\vec{J}_{CO_2}) = 0 \quad \text{Equation 149}$$

$$\frac{1}{r^2} \frac{\partial r^2 \cdot \vec{J}_{CO_2}}{\partial r} = 0 \quad \text{Equation 150}$$

$$\vec{\nabla} x_{CO_2} = - \frac{C_1}{D_{CO_2} \times r^2} \quad \text{Equation 151}$$

The Equation 151 was resolved with the boundary conditions: $x_{CO_2} = x_{CO_2}$ for $r = r_b + \delta$ and $x_{CO_2} = x_{CO_2}^*$ for $x = r_b$. The CO_2 concentration profile in the liquid film around the gas bubble was then obtained from Equation 152 and the CO_2 transfer gradient from Equation 153.

$$x_{CO_2} = \frac{(x_{CO_2} - x_{CO_2}^*) \times (r_b + \delta) \times r_b}{\delta} \times \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{r_b} \right) + x_{CO_2}^* \quad \text{Equation 152}$$

$$\frac{\partial x_{CO_2}}{\partial r} = - \frac{(x_{CO_2}^* - x_{CO_2}) \times (r_b + \delta) \times r_b}{\delta} \times \left(\frac{1}{r} \right) \quad \text{Equation 153}$$

The CO_2 liquid / gas transfer flux is then described by Equation 154

$$\Phi_{CO_2}(r) = -D_{CO_2} \times \frac{\partial x_{CO_2}}{\partial r} \times S_G \quad \text{Equation 154}$$

The O_2 gas / liquid flux is obtained by similar calculations (Equation 155).

$$\Phi_{O_2}(r) = -D_{O_2} \times \frac{\partial x_{O_2}}{\partial r} \times S_G \quad \text{Equation 155}$$

The specific area S_G corresponding to the gas volume V_G was calculated assuming that the bubbles were monosized (the bubble radius was r_b).

$$S_G = \frac{3 \times \varepsilon}{r_b} \quad \text{Equation 156}$$

The O_2 and CO_2 partial pressures in the gas phase are calculated using Equation 157 and Equation 158 and respectively.

$$pO_{2,G} = P \times n_{O_2}$$

Equation 157

$$pCO_{2,G} = P \times n_{CO_2}$$

Equation 158

The evolution of O_2 and CO_2 pressure in the gas phase are then calculated using Equation 159 and Equation 160 respectively.

$$\begin{aligned} \frac{dpCO_{2,G}(t)}{dt} &= \frac{\varepsilon \times (r + \delta) \times 3}{moles_{total} \times \delta \times r^3} \\ &\times \left(\begin{aligned} &-D_{CO_2} \times \left(\frac{pCO_{2,G}(t)}{H_{CO_2}} - x_{CO_2} \right) \\ &\times (P - pCO_{2,G}(t)) + D_{O_2} \times \left(\frac{pO_{2,G}(t)}{H_{O_2}} - x_{O_2} \right) \times pCO_{2,G}(t) \end{aligned} \right) \end{aligned}$$

Equation 159

$$\begin{aligned} \frac{dpO_{2,G}(t)}{dt} &= \frac{\varepsilon \times (r + \delta) \times 3}{moles_{total} \times \delta \times r^3} \\ &\times \left(\begin{aligned} &-D_{O_2} \times \left(\frac{pO_{2,G}(t)}{H_{O_2}} - x_{O_2} \right) \\ &\times (P - pO_{2,G}(t)) + D_{CO_2} \times \left(\frac{pCO_{2,G}(t)}{H_{CO_2}} - x_{CO_2} \right) \times pO_{2,G}(t) \end{aligned} \right) \end{aligned}$$

Equation 160

The evolution of the mole amount in the gas phase can then be calculated using Equation 161 and the correspond evolution of one bubble radius using Equation 162.

$$\frac{dmoles_{total}}{dt} = \frac{(r + \delta) \times 3}{\delta \times r^3} \times \left(\begin{aligned} &D_{CO_2} \times \left(\frac{pCO_{2,G}(t)}{H_{CO_2}} - x_{CO_2} \right) \\ &+ D_{O_2} \times \left(\frac{pO_{2,G}(t)}{H_{O_2}} - x_{O_2} \right) \end{aligned} \right)$$

Equation 161

$$\frac{dr}{dt} = \frac{P \times \varepsilon \times V_m \times (r + \delta) \times 3}{\delta \times r^3} \times \left(\begin{aligned} &-D_{CO_2} \times \left(\frac{pCO_{2,G}(t)}{H_{CO_2}} - x_{CO_2} \right) \\ &-D_{O_2} \times \left(\frac{pO_{2,G}(t)}{H_{O_2}} - x_{O_2} \right) \end{aligned} \right)$$

Equation 162

The system described by is resolved using x_{CO_2} and x_{O_2} as variables and the equimolarity of the overall transferred amounts of O_2 and CO_2 as a constraint. The bubbles are supposed to be mono-sized and the bubble radius r and the liquid film width δ are assumed to be constant. The results obtained are the evolution of the O_2 and CO_2 partial pressures in the gas phase, the

evolution of the mole amount of the gas phase, the evolution of a bubble radius over time and the value of x_{CO_2} and x_{O_2} (supposed homogeneous and constant).

The mole amount contained in a gas bubble did not change significantly as the maximum calculated increase of the mole amount of a bubble during its ascension reached 6.06 % for a 200 μm diameter with a residence time of 48.99s. These results disagree with previously reported findings for which the variation of the mole amount in a small diameter bubble due to O_2 / CO_2 counter diffusion was so important it triggered the bubble to disappear (Gray et al., 1996). The higher the bubble diameter, the lower the variation in the bubble mole amount is. It was then reasonable to assume that the mole amount of the bubble stay constant during the ascension and then to regard O_2 and CO_2 fluxes as independent to simplify the system.

The simplified system used for the calculations was then described by Equation 163 and Equation 164.

$$\frac{dpCO_{2,G}(t)}{dt} = \frac{\varepsilon \times (r + \delta) \times 3}{moles_{total} \times \delta \times r^3} \times \left(-D_{CO_2} \times P \times \left(\frac{pCO_{2,G}(t)}{H_{CO_2}} - x_{CO_2} \right) \right) \quad \text{Equation 163}$$

$$\frac{dpO_{2,G}(t)}{dt} = \frac{\varepsilon \times (r + \delta) \times 3}{moles_{total} \times \delta \times r^3} \times \left(-D_{CO_2} \times P \times \left(\frac{pO_{2,G}(t)}{H_{O_2}} - x_{O_2} \right) \right) \quad \text{Equation 164}$$

The results showed that the average absolute deviation difference between the partial pressures in the gas phase calculated with the previous model and the simplified model was below 0.70 % for CO_2 and 5 % for O_2 for a 200 μm diameter bubble.

3.2.2 Bubble Size Distribution (BSD) model

The BSD was then simulated using a logarithmic-normal density function as previously reported (Cents et al., 2005; Feldman and Mayinger, 1999; Feldman and Mayinger, 2004; Schumpe and Deckwer, 1980). Combination of the mass transfer model described in the section 3.2.1 and the BSD model led to the expression of the apparent ratio between the compound gas phase partial pressure and the liquid phase partial pressure as a function of the bubble diameter. Numerical resolution of this equation and integration over the BSD range led to the composition of the exhaust gas and then allowed the calculation of an overall volumetric transfer coefficient for each compound.

General Considerations

The bubble size was supposed to be distributed following a logarithmic normal distribution (Cents, 2003; Feldman and Mayinger, 1999; Schumpe and Deckwer, 1980).

The probability density function was calculated by Equation 165 and the cumulative distribution function by Equation 166.

$$P(x) = \frac{\exp^{-\frac{(\ln(x)-\mu_b)^2}{2\sigma_b^2}}}{x \times \sigma \times \sqrt{2\pi}} \quad \text{Equation 165}$$

$$D(x) = \left(1 + \operatorname{erf} \left(\frac{\ln(x) - \mu_b}{\sigma_b \times \sqrt{2}} \right) \right) \quad \text{Equation 166}$$

With the error function erf defined by Equation 167.

$$\operatorname{erf}(x) = \frac{2}{\sqrt{\mu_b}} \int_0^x e^{-t^2} dt \quad \text{Equation 167}$$

The mean, variance and skewness of the BSD were calculated using Equation 168, Equation 169 and Equation 170 respectively.

$$\text{mean} = e^{\mu_b + \sigma_b^2} \quad \text{Equation 168}$$

$$\text{variance} = \left(e^{\sigma_b^2} - 1 \right) e^{2\mu_b + \sigma_b^2} \quad \text{Equation 169}$$

$$\text{skewness} = \left(e^{\sigma_b^2} + 2 \right) \sqrt{e^{\sigma_b^2} - 1} \quad \text{Equation 170}$$

Bubble volume and surface probability density functions

The normalized probability density function for the bubble volume was then defined by Equation 171 and the probability function for the bubble surface by Equation 172. Normalization was carried out using the volume and surface probability value reached for the highest radius of the considered distribution.

$$V(r) = \exp^{-\left(3\mu_b + \frac{9}{2}\sigma_b^2\right)} \times r^3 \times \frac{\exp^{-\frac{(\ln(r)-\mu_b)^2}{2\sigma_b^2}}}{r \times \sigma_b \times \sqrt{2\pi}} \quad \text{Equation 171}$$

$$S(r) = \exp^{-2(\mu_b + \sigma_b^2)} \times r^2 \times \frac{\exp^{-\frac{(\ln(r)-\mu_b)^2}{2\sigma_b^2}}}{r \times \sigma_b \times \sqrt{2\pi}} \quad \text{Equation 172}$$

Bubble residence time

The bubble rise velocity relative to the liquid was assumed to be equal to their terminal velocity as in (Cents, 2003; Linek et al., 2005) and hence to be inversely proportional to their radius. The lower the bubble diameter, the higher the bubble residence time in the reactor. The bubble terminal velocity was calculated using Stoke's law (Equation 173) since the maximal bubble Reynolds was calculated to be 2.1 for a 1 mm diameter bubble. The bubble residence time τ_r was calculated from the corresponding terminal velocity.

$$U_t = \frac{2 \times r^2 \times g \times (\rho_l - \rho_g)}{9 \times \mu_b} \quad \text{Equation 173}$$

The normalized inlet flow rate probability density function for a bubble of radius r can then be calculated from Equation 174. Normalization was carried out using the flow rate probability value reached for the highest radius of the considered distribution.

$$Q_{in}(r) = \frac{V(r)}{\tau(r)} = \exp^{-5(\mu_b + \frac{5}{2}\sigma_b)} \times r5 \times \frac{\exp^{-\frac{(\ln(r) - \mu_b)^2}{2\sigma_b^2}}}{r \times \sigma_b \times \sqrt{2\pi}} \quad \text{Equation 174}$$

Bubble coalescence was not considered owing to the non-coalescing nature of the fermentation broth (Fyferling et al., 2008). It is then assumed that there is a pseudo steady-state between the BSD distribution generated by the sparger and dispersed by the stirring modules and the BSD distribution leaving the reactor in the exhaust gas. These two distributions are identical but different from the BSD of the gas dispersion in the reactor due to the size dependency of the bubbles residence time.

CO₂ and O₂ transfer

The geometrical surface $S(r)$ of a bubble of radius r can be calculated using Equation 175.

$$S(r) = N_g \times P(r) \times 4 \times \pi \times r^2 \quad \text{Equation 175}$$

With N_g calculated from Equation 176 as the ratio between the observed dispersed gas volume during the experiment and the cumulative volume of a bubble distribution.

$$N_g = \frac{\varepsilon \times V_L}{\frac{4}{3} \times \pi \times \exp^{(3\mu_b + \frac{9}{2}\sigma_b)}} \quad \text{Equation 176}$$

The O₂ gas / liquid and CO₂ liquid / gas transfer fluxes are then obtained from Equation 155 using Equation 175 to calculate the specific surface for each bubble radius. For each bubble radius it was then possible to calculate the evolution of the O₂ and CO₂ partial pressure in the gas phase (Equation 177 and Equation 178). O₂ and CO₂ fluxes were considered to be independent as this assumption was previously proved to be reasonable.

$$\frac{dp_{CO_{2,G}}(r,t)}{dt} = \frac{\varepsilon \times (r + \delta) \times 3}{moles_{total} \times \delta \times r^3} \times \left(-D_{CO_2} \times \left(\frac{p_{CO_{2,G}}(r,t)}{H_{CO_2}} - x_{CO_2} \right) \times P \right)$$

Equation 177

$$\frac{dp_{O_{2,G}}(r,t)}{dt} = \frac{\varepsilon \times (r + \delta) \times 3}{moles_{total} \times \delta \times r^3} \times \left(-D_{O_2} \times \left(\frac{p_{O_{2,G}}(r,t)}{H_{O_2}} - x_{O_2} \right) \times P \right)$$

Equation 178

The initial conditions were $p_{CO_{2,G}}(t=0, r) = 3647$ Pa and $p_{O_{2,G}}(t=0, r) = 21217$ Pa. The solutions were then given by Equation 179 for O_2 and Equation 180 for CO_2 .

$$p_{O_{2,G}}(r,t) = p_{O_{2,L}} \times H_{O_2} + (p_{O_{2,G}}(t=0, r) - p_{O_{2,L}} \times H_{O_2}) \times \exp\left(\frac{3 \times D_{O_2} \times (r + \delta) \times P \times \varepsilon \times t}{Q \times moles_{total} \times r^3 \times \delta \times H_{O_2}}\right)$$

Equation 179

$$p_{CO_{2,G}}(r,t) = p_{CO_{2,L}} \times H_{CO_2} + (p_{CO_{2,G}}(t=0, r) - p_{CO_{2,L}} \times H_{CO_2}) \times \exp\left(\frac{3 \times D_{CO_2} \times (r + \delta) \times P \times \varepsilon \times t}{Q \times moles_{total} \times r^3 \times \delta \times H_{CO_2}}\right)$$

Equation 180

The time dependency of these equations is solved by considering that the residence time of a bubble is dependent of its size (Equation 181).

It is then possible to numerically calculate the ratio between the partial pressure in a bubble of radius r and the partial pressure in the liquid phase. The skewness of the BSD generated by the stirring and the aeration determines the proportion of bubbles that are not at equilibrium with the liquid phase and that actively participate in the effective transfer. The proportion of bubbles that are not at equilibrium with the liquid phase increases with higher BSD skewness (Figure 9).

$$\tau(r) = \frac{V(r) \times \varepsilon}{Q(r) \times Q} = \frac{\varepsilon \times \exp^{2 \times (\mu + 4 \times \sigma^2)}}{x^2}$$

Equation 181

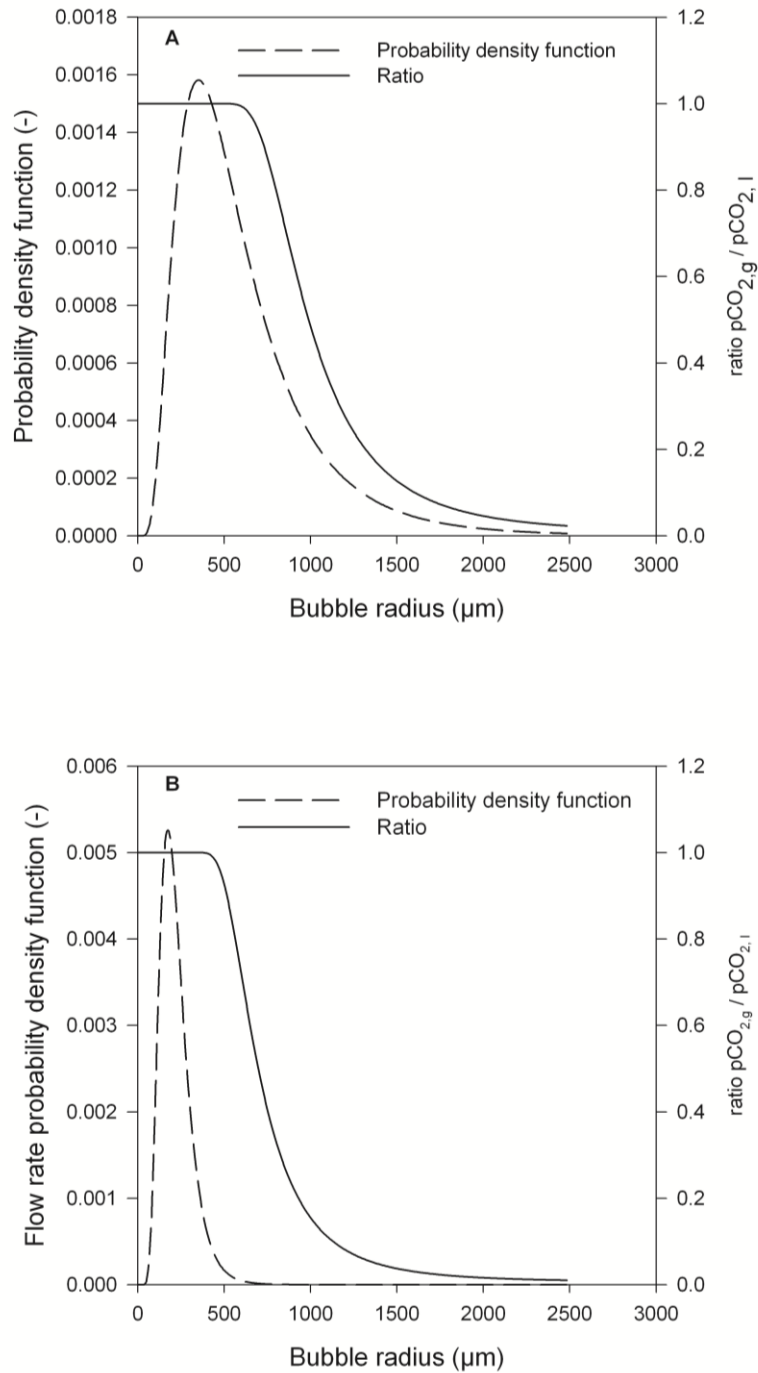


Figure 22. Influence of the BSD skewness on the flow rate probability density function and the partial pressures ratio between the gas and the liquid phase (a: skewness = 2.26 and mean bubble diameter = 400 μm ; b : skewness 1.32 and mean bubble diameter = 400 μm).

By integrating on the whole size distribution one can recalculate the exhaust gas composition. Therefore, the O_2 overall volumetric transfer coefficient obtained from the calculated BSD can be estimated.

System solving

BSD were modelled based on the experimental results. The variables μ_b , σ_b and x_{CO_2} were calculated so that the calculated $K_T(O_2)$ fitted the observed $K_T(O_2)$. The following constraints were respected: i) the calculated overall ratio between the $pCO_{2,l}$ and the $pCO_{2,g}$ equalled the observed ratio ii) the simulated overall respiratory quotient equalled the observed RQ.

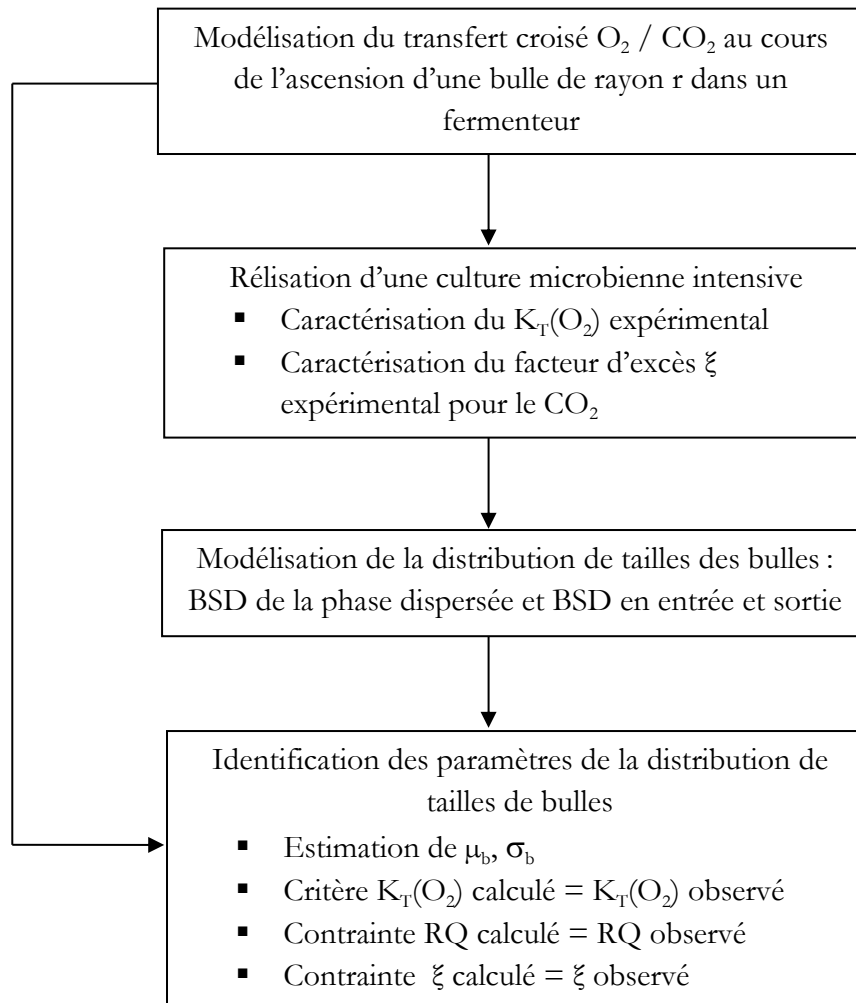


Figure 23. Démarche adoptée pour la résolution du mécanisme de transfert liquide / gaz du CO₂.

3.3 Publication

Insights into carbon dioxide liquid / gas transfer during an intensive microbial culture

Lannig Richard¹²³, Luc Fillaudeau¹²³, Stéphane Guillouet¹²³⁴, Jean-Louis Uribelarrea¹²³.

¹ Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Av. de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

² INRA, UMR792, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France.

³ CNRS, UMR5504, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse F-31400, France.

⁴ Corresponding author at Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés – INSA, UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France. Email adress : Stephane.Guilouet@insa-toulouse.fr. Phone : +335 61 55 94 47.

3.3.1 Abstract

The aim of the study was to investigate the CO₂ liquid / gas mass transfer dynamics during an intensive yeast culture working at high CO₂ production rate and under various conditions of aeration and power dissipation.

An intensive aerobic culture of *S. cerevisiae* was carried out with a high CO₂ production rate (up to 0.08 mole.m⁻³.s⁻¹), high gaseous transfer performances (O₂ overall volumetric transfer coefficient up to 0.48s⁻¹). A high CO₂ supersaturation was observed in the liquid phase compared to the gas phase during the culture as the normalized CO₂ partial pressure in the liquid phase was up to 1.26 times the CO₂ partial pressure in the exhaust gas. This supersaturation could not be explained by the existing literature as no CO₂ excess in the liquid phase should have been observed in view of the high O₂ transfer performances.

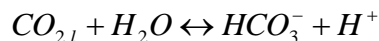
We extended the literature description on CO₂ liquid / gas transfer in order to explain the observed phenomena. First, we demonstrated through a modelling work that O₂ / CO₂ counter diffusion from / toward dispersed bubbles and the bubble size must be considered when dealing with gaseous transfer in aerobic microbial culture and can impact the CO₂ liquid / gas transfer. Moreover, we pointed out that an asymmetric bubble size distribution (BSD) may cause the observed high CO₂ supersaturation in the fermentation broth. Finally, we calculated the BSD skewness and mean diameter values evolution during the culture and their dependencies towards aeration and power uptake to confirm that hypothesis.

Keywords: CO₂; mass transfer; supersaturation; intensive microbial culture; yeast.

3.3.2 Introduction

Carbon dioxide (CO₂) is a major compound of the microbial metabolism both as a substrate and as a product. It has been shown that CO₂ and bicarbonate ions are required for yeast growth (Aguilera et al., 2005b) and CO₂ is produced by the yeast metabolism (TCA cycle, ethanol production, anabolic reactions). Moreover it has long been known that high dissolved CO₂ concentrations have an inhibitory effect on yeast physiology although the mechanisms underlying CO₂ sensitivity have not been elucidated to date (Aguilera et al., 2005b; Chen and Gutmanis, 1976; Jones and Greenfield, 1982). In submerged microbial cultures dissolved carbon dioxide concentration depends on the CO₂ production by the microorganism, on the equilibria with bicarbonates ions in the liquid phase and on the liquid / gas transfer rate. The CO₂ produced by the microorganism diffuses through the cellular membranes and dissolves into the fermentation

broth. Within the liquid phase CO_2 is involved in reversible chemical reactions with carbonic acid and bicarbonate ions which are generally lumped into one hydration reaction (Johnson, 1982) (Equation 1). These species form the total inorganic carbon (TIC).



Equation 182

The corresponding equilibrium constant pK_1 of 5.918 (Roy et al., 1993) dictates that at pH 5.0 the concentration of carbonate ions represents 10.7 % of the total inorganic carbon concentration. CO_2 is the only specie involved in biomass / liquid and liquid / gas transfer phenomena (Jones and Greenfield, 1982; Royce and Thornhill, 1991).

The assessment of CO_2 impact on micro-organism metabolism through a quantitative physiology approach requires then the quantification of dissolved CO_2 concentration, which is rarely measured but calculated from the composition of the exhaust gas. It is a common hypothesis to assume the dissolved CO_2 concentration to be at equilibrium with the CO_2 partial pressure in the exit gas and then to calculate the dissolved CO_2 concentration through Henry's law with the assumption that the partial pressure gradient required for the desorption process can be neglected (Aguilera et al., 2005b; Bäumchen et al., 2007; Chen and Gutmanis, 1976; Jones and Greenfield, 1982; Onken and Liefke, 1989). This hypothesis may then lead to an under-estimation of dissolved CO_2 concentration in the fermentation broth. The simple two film theory has been widely used to describe the O_2 mass transfer between the gas phase and the broth in bioprocesses (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009). It is generally assumed that the CO_2 liquid / gas transfer can also be described using this theory (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977). As the CO_2 diffusion coefficient in the gas film is 10^4 higher than the diffusion coefficient in the liquid side ($1.7 \times 10^{-5} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ (Marrero and Mason, 1972) and $2.25 \times 10^{-9} \text{ m}^2.\text{s}^{-1}$ (Green and Perry,) at 30.0°C in air and pure water respectively) the gas side resistance can be ignored even if CO_2 is 23 times more soluble than O_2 in the fermentation broth (at 30.0°C in the medium used in that study $H_{\text{CO}_2} = 2.791 \times 10^{-4} \text{ mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$ and $H_{\text{O}_2} = 1.206 \times 10^{-5} \text{ mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$). The main transfer resistance is then located in the liquid film as in O_2 gas / liquid transfer. The CO_2 transfer coefficient is then calculated from the O_2 transfer coefficient corrected by the ratio of diffusivities D_{CO_2} and D_{O_2} (Equation 2) (Royce and Thornhill, 1991). Royce and Thornhill assumed that the mass transfer coefficients were dependent on the two-third power of the diffusivities as the mean bubble size in stirred tank reactors are generally less than 2 mm and the bubbles are then considered as rigid (Alves et al., 2004).

$$\frac{k_L(CO_2)}{k_L(O_2)} = \left(\frac{D_{CO_2}}{D_{O_2}} \right)^{2/3} \quad \text{Equation 183}$$

It is assumed that the interfacial area for mass transfer between the liquid phase and the gas phase is the same for CO₂ and O₂. The theoretical CO₂ volumetric liquid / gas transfer coefficient can then be calculated from the O₂ volumetric gas / liquid coefficient (Royce, 1992; Yagi and Yoshida, 1977). The excess factor ξ was then introduced by Royce and Thornhill to characterize the dissolved carbon dioxide concentration calculated from the exit gas composition over the concentration calculated assuming the equilibrium between the gas and the liquid phase (Equation 184) (Royce and Thornhill, 1991) .

$$\xi = \frac{[CO_{2,l}]}{[CO_{2,l}]_{eq}} \approx 1 + \frac{Q \times H_{CO_2}}{60 \times R \times T \times (0.89 \times K_L a_{O_2})} \quad \text{Equation 184}$$

The CO₂ volumetric transfer coefficient has been experimentally investigated using model media or modelling studies (Gray et al., 1996; Hill, 2006; Kordač and Linek, 2008; Matsunaga et al., 2009a; Matsunaga et al., 2009b; Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011). Strikingly some of the reported K_T(CO₂) were lower than expected from the K_T(O₂) (Equation 2) and showed a strong dependency towards the aeration rate but were almost independent of the power dissipation (Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011). These results were related to saturation of ascending bubbles by CO₂ and then limitation of CO₂ stripping as already proposed in a modelling work (Gray et al., 1996). Although these studies gave valuable insights into CO₂ liquid / gas transfer the range of power uptake and gas superficial velocity was narrow, the influence of O₂ counter diffusion on CO₂ liquid / gas transfer was often not considered and these works were not carried out in real culture conditions where the biological reaction can impact the transfer phenomena.

Very few studies have reported experimentally measured volumetric CO₂ liquid / gas transfer coefficients during microbial cultures as this calculation required dissolved CO₂ concentration measurement (Tableau 35). Strikingly, the few experimentally measured K_T(CO₂) often significantly differ from the K_T(O₂) (Tableau 35) which means that during microbial cultures the dissolved CO₂ concentration may be higher than theoretically predicted using the literature approach (Equation 2). This may be a particular concern for high cells density microbial cultures where high respiration rates are reached as CO₂ build up in the fermentation broth may occur and may deeply affect the microorganism physiology and then the process quality. The understanding of the mechanism leading to this unexpected accumulation of dissolved CO₂ in the fermentation broth seems therefore to be a major stake for quantitative physiology studies and bioprocess design.

Tableau 35. CO₂ liquid / gas transfer in microbial cultures: literature review.

Conditions	K_T	Reference
STR V = 1.5 L <i>Pseudomonas aeruginosa</i> batch culture $[X]_{\max} = 7.5 \text{ g}_{\text{DW}} \cdot \text{L}^{-1}$ $e = 3341 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3 \text{ a}}$ et $Us = 2.66 \times 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1 \text{ b}}$	$K_T(\text{CO}_2) \approx 200 \text{ h}^{-1 \text{ b}}$ $K_T(\text{O}_2) \approx 395 - 674 \text{ h}^{-1 \text{ b}}$	(Yagi and Yoshida, 1977)
STR V = 14 L <i>Penicillium chrysogenum</i> batch culture [X] not defined $e = 21138 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3 \text{ a}}$ et $Us = 3.80 \times 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1 \text{ b}}$	$K_T(\text{CO}_2) \approx 76 \text{ h}^{-1 \text{ b}}$ $K_T(\text{O}_2) \approx 2500 \text{ h}^{-1 \text{ c}}$	(Smith and Ho, 1985)
STR V = 2 L <i>Corynebacterium</i> batch culture No informations on e ou Us	$K_T(\text{O}_2) < 100 \text{ h}^{-1}$ $K_T(\text{CO}_2) / K_L a(\text{O}_2) = 0.2-0.7$	(Hiltbrunner and Zizek, 2006)
STR perfusion V = 10 L and V = 500 L CHO perfusion culture [X] not defined $e \approx 1 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3 \text{ a}}$	$K_T(\text{CO}_2) = 0.17 \text{ h}^{-1}$ et 2.31 h^{-1} $K_T(\text{O}_2) = 4.35 \text{ h}^{-1}$ et 3.91 h^{-1}	(Gray et al., 1996)
STR VL de 0.1 à 63 m ³ No informations on the culture	$K_T(\text{CO}_2) / K_T(\text{O}_2) = 0.05$	(Sherstobitova and Bylinkina, 1977)
STR V = 600 L <i>Streptomyces</i> fed-batch culture $e \approx 5000 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3 \text{ a}}$ and $Us = 1.06 - 2.02 \times 10^{-2} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1 \text{ b}}$	$K_T(\text{CO}_2) / K_T(\text{O}_2) = 0.33$ for low viscosity broth (<100 cp). $K_T(\text{CO}_2) / K_T(\text{O}_2) = 0.6$ for high viscosity broth (3000 cp).	(Dahod, 1993)

^a Estimated from the data reported by the authors using Hughmark correlation (Hughmark, 1980)

^b Calculated by the authors using a plug flow assumption for gas phase axial dispersion

^c Calculated using Van't riet correlation (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009).

In this study we investigated the CO₂ liquid / gas transfer during an intensive yeast culture working at high CO₂ production rate and under various conditions of aeration and power dissipation. The CO₂ and O₂ gaseous transfer dynamics throughout the culture as well as the influence of power dissipation and aeration on these dynamics were investigated and compared with the existing literature. We also conducted modelling work to examine the influence of O₂ and CO₂ counter diffusion from / to dispersed bubbles on the transfer dynamics.

3.3.3 Material and methods

3.3.3.1 Reactor setup

Fed-batch cultivation was performed in a 23 L bioreactor (Biostat E, type ES15B, Braun Biotech International, Germany) on a fed-batch mode. The reactor was jacketed, had a concave bottom, an inner diameter of 0.21 m, a height of 0.63 m. The following configuration was used: four 0.46

m height baffles, one O-ring sparger located at the bottom, 3 Rushton turbines (six blades, 0.084 m external diameter, 17 mm width) placed at 5.5, 18.0 and 30.0 cm from the bottom and driven by a 746 W motor. A mass – flow controller (model 5850 TR, Brooks, USA) was used to control the inlet air flow rate. B-Braun DCU was used as a PID controller for the regulation of stirring rate, pH, temperature and relative pressure. Home-made software was used for the on-line acquisition of these parameters and dissolved O₂ partial pressure, to control the feeds (glucose, ammonia, salt medium, antifoam) and to calculate secondary data (respiration rates, respiratory quotient, liquid volume). Data were recorded every 45 s. The temperature was kept at 30.32 ± 0.03 °C and the pH was regulated at 4.98 ± 0.02 by addition of 14% (w/w) NH₃ solution. The relative pressure was kept at 0.3 bars. The reactor was equipped with a foam detection system (Sartorius, Germany) and foam formation was prevented by the controlled addition of Struktol JG73 (Schill-Seilacher, Germany). The maximal antifoam concentration added was 24.70 ppm. During the culture the reactor was supplied with four sterile feed solutions (glucose, salt medium, ammonia and antifoam) using peristaltic pumps (B-Braun FE411 for glucose; Gilson Minipuls 3, Gibson, France; B-Braun DCU peristaltic pumps for ammonia and anti-foam) and Masterflex tubing. The glucose solution concentration was 680.47 g/L and the ammonia solution concentration was 8.20 N. Masses of glucose, salt medium and ammonia added to the reactor were calculated by weighing the feed bottles (balance IB16000S for glucose; balances CP2202S for salt medium and ammonia additions, Sartorius, Germany).

3.3.3.2 On-line measurements

Outlet gas composition was analyzed using a gas analyser (URAS-8, B-Braun, Germany): O₂ fraction was measured using a polarographic method and CO₂ fraction using infra-red absorption. Data were recorded every 30s. The pH was measured using an 11.3 cm Fermprobe (Broadley and James, USA). The dissolved O₂ partial pressure, expressed as a percentage of O₂ saturation in the initial medium at operating pressure and temperature, was measured using a 8.4 cm long D435 Oxyprobe probe (Broadley and James, USA) located 10 cm above the bottom at an inclination of 15°. The probe response time at 30.0°C was estimated to be 15.04 s according to the manufacturer's data. The dissolved CO₂ partial pressure, expressed as a percentage of CO₂ saturation in the initial medium at operating pressure and temperature, was measured using a 12.0 cm YSI 8500 probe (Yellow Spring Instrument, USA) located 10 cm above the bottom at an inclination of 15°. Data were acquired every 15s. The dynamics of that probe can be approximated using a first order model as it is the case for dissolved O₂ probes (Pattison et al.) The time constants of the probe was identified measuring the probe responses to dissolved

concentration 5% step increases and decreases at 30.0°C in water and fitting the observed responses with a first order model following a least-squares criteria (Taymaz-Nikerel et al., 2011). The time constant of the probe (τ_{CO_2}) at 30.0°C was estimated to be 124 s. The raw signals from the $\text{pO}_{2\text{l}}$ and $\text{pCO}_{2\text{l}}$ probes were corrected using the corresponding response times. The hold-up ε was evaluated from the level of the gas-liquid dispersion and the liquid volume (Fyferling et al., 2008) and the dissipated power was calculated from (Hughmark, 1980).

3.3.3.3 Analytical methods

Supernatant sampling was carried out using a cross-flow filtration unit (Applikon, The Netherlands) and a fraction collector (Fraction Collector Frac-100, Pharmacia fine chemicals, USA) set up in an external recirculation loop operated with a peristaltic pump (Masterflex 77521-57, Cole-Parmer USA). Broth sampling was carried out using a syringe. Supernatant and broth mass densities were measured at 30.0°C using a DE40 densimeter (Mettler Toledo, Switzerland). Each assay was performed in triplicate: the reproducibility of the measurement was $< 0.5 \text{ kg.m}^{-3}$. Surface tension between the supernatant or the broth and air was measured at 30.0°C with a Digidrop GBX3S tensiometer (GBX, France) using the Wilhemy platinum blade method. Each assay was performed in triplicate and the reproducibility of the measurement was $< 1 \text{ mN.m}^{-1}$. Supernatant and broth dynamic viscosities were measured according to (Manon et al., 2011). Acetate and ethanol concentrations in the supernatant were measured using gas chromatography (Alfenore et al., 2002). The residual glucose concentration in the supernatant was measured using an YSI 27A analyzer (Yellow Spring Instrument, USA).

Biomass concentration was estimated by spectrophotometric measurement at 620 nm using a Hitachi U-1100 spectrophotometer (Hitachi, Japan). Dry cell weight measurements were carried out by filtering a known volume of broth on a 0.45 μm pore-size polyamide filter and drying it to a constant weight at 60°C under a partial vacuum (0.263 bars) during 48h. The biomass composition formula used in the calculations was $\text{CH}_{1.78}\text{O}_{0.56}\text{N}_{0.16}\text{P}_{0.012}\text{S}_{0.0036}$ with 6% ashes, corresponding to a molar weight of 26.94 g.Cmole^{-1} .

3.3.3.4 Micro-organism and media

The haploid wild-type strain *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D was grown on YPD plates (Yeast extract 10 g.L^{-1} , Bacto-peptone 20 g.L^{-1} , D-glucose 20 g.L^{-1}) at 30.0°C. Pre-cultures were grown from a colony in 5 mL tube of YPD medium at 30.0°C for 12h on a rotary shaker (120 rpm). Each tube was transferred to a 250 mL Erlenmeyer flask with 50 mL defined synthetic medium

(pH 5.0) prepared using water and containing per liter : $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.6 g; KH_2PO_4 4.8 g; $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 3.2 g; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.1 g; Sodium glutamate 1.1 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.0377 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.00156 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0481 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.00672 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0064; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.0481; H_3BO_3 0.0004; $(\text{NH}_4)_2\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.0694 g. The ionic strength of the minimal medium was estimated to be $I = 137 \text{ mole} \cdot \text{m}^{-3}$ at pH 5.0. Filter sterilized vitamins were added after heat sterilization (final concentrations per liter): d-biotine 0.1 mg; panthotenic acid 2 mg; nicotinic acid 2 mg; myo-inositol 50 mg; thiamine hydrochloride 2 mg; pyridoxine hydrochloride 2 mg; para-amino benzoic acid 0.4 mg. Glucose was added at a final concentration of $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Two flasks of this pre-culture were used to inoculate two 1L Erlenmeyer flasks with 450 mL defined synthetic medium supplemented with vitamins and glucose as described previously. These two flasks were used to inoculate 9 L of the synthetic defined medium in the reactor. The salts feed flow rate was ten times smaller than the glucose feed flow rate. The feed medium was prepared using tap water and contained (per liter of the feed medium): $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 36 g; $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.092 g; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 1.49 g; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.143 g; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.301 g; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g; H_3BO_3 0.035 g; $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 0.103 g; $\text{Fe}(\text{SO}_4)_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 3 g; NaCl 10 g; KCl 55.83 g; H_3PO_4 90.733 g; H_2SO_4 212.56 g.

3.3.3.5 Culture strategy

Glucose flow was increased exponentially to set a constant specific growth rate and to avoid ethanol and acetate production. The inoculation of the fermentor with the pre-cultures was performed at $t = 0 \text{ h}$ and the specific growth rate overnight was set to 0.25 h^{-1} . The salts medium supply was ten times smaller than the glucose feed flow rate. The aeration and stirring rate were first set at $200 \text{ NL} \cdot \text{h}^{-1}$ and 400 rpm respectively. These parameters were sequentially increased to $700 \text{ NL} \cdot \text{h}^{-1}$ and 1500 rpm to avoid O_2 limitation and to investigate their influence on CO_2 liquid / gas transfer. The $p\text{O}_{2,1}$ remained higher than 4% during the culture. The results were analyzed from $t = 13 \text{ h}$ ($\epsilon = 3,200 \text{ W} \cdot \text{m}^{-3}$, $U_s = 1.5 \times 10^{-3} \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ and $[\text{X}] = 5.8 \text{ g}_{\text{DW}} \cdot \text{L}^{-1}$).

3.3.3.6 Calculation of O_2 gas / liquide volumetric transfer coefficient

The O_2 consumption rate, the CO_2 production rate and the volumetric transfer coefficients for O_2 were calculated assuming according to the gas balance method (Equation 185 and Equation 186). Dynamic equilibria of dissolved carbon dioxide with bicarbonates and carbonates ions were considered in the carbon dioxide balance (Equation 186).

$$r_{O_2} = \frac{\frac{d(x_{O_2} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(O_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt} + Q_{G,in} \cdot O_2^{in} - Q_{G,out} \cdot O_2^{out} + Q_{L,in} \cdot x_{O_2,in} - Q_{L,out} \cdot x_{O_2}}{V_{LB}}$$

Equation 185

$$r_{CO_2} = \frac{\frac{d(x_{TIC} \cdot V_L)}{dt} + \frac{d(CO_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt} - Q_{G,in} \cdot CO_2^{in} + Q_{G,out} \cdot CO_2^{out} - Q_{L,in} \cdot x_{TIC,in} + Q_{L,out} \cdot x_{TIC}}{V_{LB}}$$

Equation 186

The time delay between the outlet of the reactor and the gas analyzer was considered in the calculations. The following hypotheses were made for the calculation of O₂ overall volumetric transfer coefficients:

- The liquid phase was assumed to be perfectly homogeneous (Moucha et al., 2012)
- The O₂ and CO₂ concentration at the gas / liquid interface were assumed to be at equilibrium with the concentration in the gas phase through Henry's law (Equation 6).

$$x^* = R.T.H.y$$

Equation 187

- A plug flow axial dispersion of the gas phase was considered. This hypothesis was supported by i) the high height to diameter ratio (varying from 1.31 to 1.75 during the culture) (Van't Riet, 1979) ii) a significant variation of the gas phase composition due to O₂ depletion : O₂ transfer efficiency reached 47 % (Van't Riet and Tramper, 1991) iii) the non –coalescing nature of the fermentation broth due to its high ionic strength value (I = 137 mole.m⁻³) (Moucha et al., 2012) ii) the upstream modelling work. O₂ gradient was then calculated using logarithmic means (Equation 8).

- The liquid volume involved in O₂ gas / liquid transfer and carbon liquid / gas transfer V_{LB} was calculated subtracting the wet cells volume V_C from the total broth volume V_L. The wet cells volume was calculated according to (Fyferling et al., 2008) considering a mean wet cell volume of 1.5 mL.g_{DW}⁻¹.

- CO₂ diffused into the ascending air bubbles as the x_{CO2} values reached during yeast culture are lower than the concentrations required for homogeneous and heterogeneous nucleation phenomena to take place (Voisin, 2005) making CO₂ bubble nucleation unlikely

The oxygen gas / liquid transfer flux Φ_{O_2} was calculated from (Equation 188) with O_2^{exit} defined as the oxygen mole fraction in the gas at the broth exit (Equation 189).

$$\Phi_{O_2} \cdot V_L = Q_{G,in} \cdot O_2^{in} - Q_{G,out} \cdot O_2^{exit}$$

Equation 188

$$O_2^{exit} = \frac{\frac{d(O_2 \cdot V_G^{Headspace})}{dt} + Q_{G,out} \cdot O_2^{out}}{Q_{G,out}} \quad \text{Equation 189}$$

The overall volumetric transfer coefficient for O_2 ($K_T(O_2)$) was then calculated from Equation 190.

$$K_T(O_2) = \frac{\Phi_{O_2} \times V_{LB}}{V_{LB} \times (x_{O_2}^* - x_{O_2})_{lm}} \quad \text{Equation 190}$$

Henry's law coefficients for O_2 and CO_2 in the initial medium at 30.0°C were calculated to be $1.206 \times 10^{-5} \text{ mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$ (Weisenberger and Schumpe, 1996) and $2.791 \times 10^{-4} \text{ mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$ (Dickson and Millero, 1987) respectively.

3.3.4 Results

3.3.4.1 Mass transfer model

During aerobic microbial cultures O_2 diffuses from the ascending bubbles to the liquid phase where it is consumed by the micro-organisms leading to the production of CO_2 that diffuses from the liquid phase to the gas phase. O_2 and CO_2 fluxes are then in opposite direction. In oxidative microbial culture with glucose as carbon source these fluxes are roughly equivalent as the respiratory quotient is close to unity. A simple model was created to estimate the evolution of the O_2 and CO_2 partial pressures in the gas phase during bubble ascension in the bioreactor. Details of the calculations can be found in the section 3.2.1. Simulations showed that the O_2 partial pressure in the gas phase decreased almost exponentially over the bubble ascension time (Figure 24 and c) which means that the O_2 gas / liquid gradient used for the calculation of the overall volumetric transfer coefficient $K_T(O_2)$ can be estimated satisfactory enough using a logarithmic mean (Equation 191) except for small bubbles.

$$(x_{O_2}^* - x_{O_2})_{lm} = \frac{P.H_{O_2} \cdot (O_2^{in} - O_2^{exit})}{\ln \left(\frac{P.H_{O_2} \cdot O_2^{in} - x_{O_2}}{P.H_{O_2} \cdot O_2^{exit} - x_{O_2}} \right)} \quad \text{Equation 191}$$

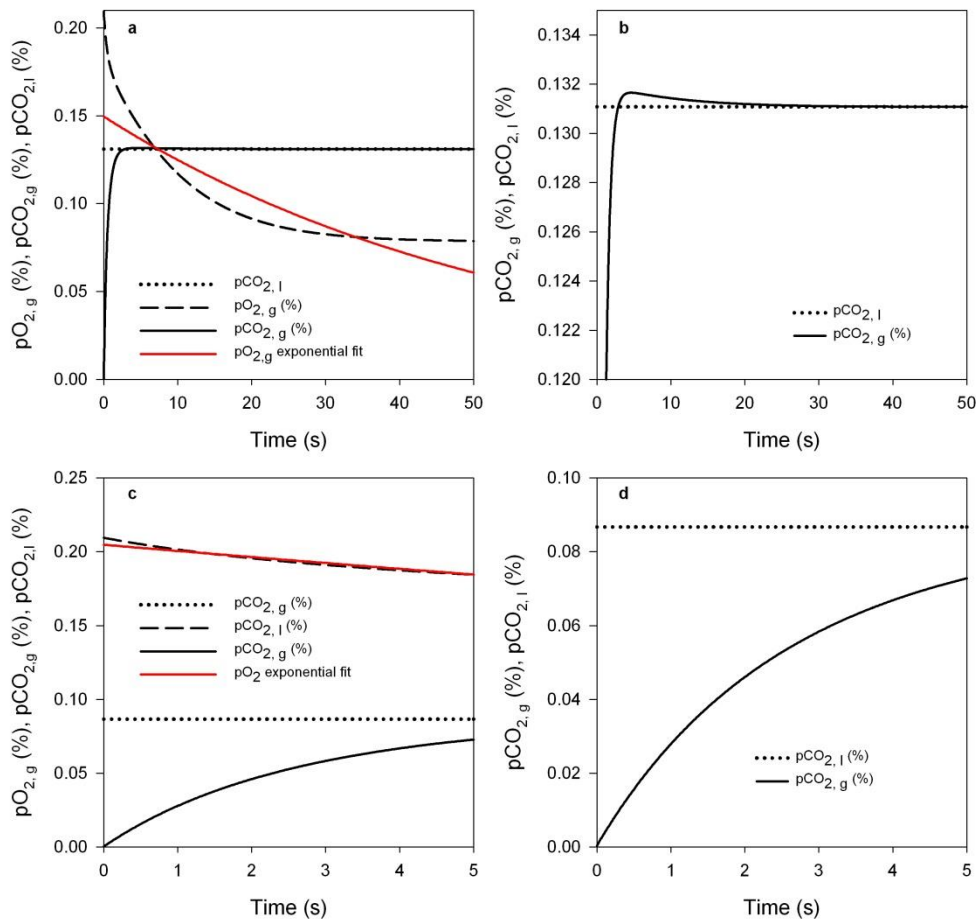


Figure 24. **a** Simulation of the evolution of the O₂ and CO₂ partial pressures in a 200 μm diameter bubble (residence time 50 s) ascending the reactor (pCO_{2,g} = 0 at t = 0s) **b** Detail of the pCO_{2,g} overshoot for a 200 μm diameter bubble **c** Simulation of the evolution of the O₂ and CO₂ partial pressures in a 1000 μm diameter bubble (residence time 2 s) ascending the reactor (pCO_{2,g} = 0 at t = 0s) **d** Details on the pCO_{2,g} evolution (no overshoot). The K_T(O₂) was considered to be 0.5 s⁻¹, the dissolved O₂ and CO₂ concentration 9.5 x 10⁻² and 3.70 mole.m⁻³ respectively.

On the other hand, the results showed that, for small bubbles, the CO₂ partial pressure in the gas phase increased quickly during the bubble ascension overshoot the CO₂ partial pressure in the liquid phase and eventually decreased (Fig. 1 b). The high CO₂ solubility created a high CO₂ liquid / gas transfer gradient and then a high CO₂ transfer flux value during the first seconds of the bubble ascension as already reported in (Sieblist et al., 2011). Therefore the CO₂ liquid / gas transfer during the first seconds of the bubble ascension is much higher than the opposite O₂ gas / liquid transfer. Hence, the variation in the mole amount in the bubbles ascending the reactor ought to be considered.

The pCO_{2,g} subsequently overshoot the pCO_{2,l} due to the transfer of O₂ from the gas phase to the liquid phase that continued after the completion of CO₂ transfer. Consequently the CO₂ transfer reversed during the last phase of the ascension of small bubbles (high residence time) and eventually took place from the gas phase to the liquid phase. These results showed that, for small bubbles, the pCO_{2,l} may be lower than the pCO₂ in the exhaust gas making impossible the

calculation of a liquid / gas volumetric transfer coefficient for CO₂ from the inlet and outlet gas measurement (Fig. 1 a and b). These findings were not expected from the literature (Gray et al., 1996; Sieblist et al., 2011) as the variation of the mole amount in the bubbles was not considered in these studies. On the other hand for large size (low residence time) it was shown that the pCO_{2,g} remained lower than the pCO_{2,l} during the bubble ascension, allowing the calculation of an apparent K_T(CO₂) (Figure 24 c and d).

3.3.4.2 *S. cerevisiae* fed-batch culture

S. cerevisiae was cultivated on a fed batch mode up to a final biomass concentration of 38.5 g_{DW}.L⁻¹ and a maximal CO₂ production rate of 0.31 mole.L⁻¹.h⁻¹. An overview of the culture is shown in Figure 25. The specific growth rate was set by the glucose feeding flow rate and ranged between 0.20 and 0.28 h⁻¹. Small concentrations of acetate (up to 0.084 g.L⁻¹) and ethanol (up to 1.633 g.L⁻¹) were detected at some points during the culture indicating that the metabolism was mainly oxidative. The respiratory quotient was constant at 1.07 ± 0.04 during the first phase (Figure 25 a). Overall carbon and redox balances closed within 3 % and 5% error respectively proving the data consistency. The smoothed data were reconciled (van der Heijden et al., 1994).

The O₂ consumption rate reached 0.31 mole.L⁻¹.h⁻¹ after 22 h of culture. The power uptake and the superficial gas velocity were increased stepwise from 3,200 to 27,914 W.m⁻³ and from 1.5× 10⁻³ m.s⁻¹ to 5.5 × 10⁻³ m.s⁻¹ respectively (Figure 25 b). The initial gas retention at t = 0h (e = 1120 W.m⁻³ and U_s = 1.5× 10⁻³ m.s⁻¹) was 0.02 (data not shown). During the culture the hold-up progressively increased to reach very high values up to 0.5. The observed hold-up was compared with hold-up values obtained in a coalescent medium (distilled water) and a non-coalescing ionic medium (Na₂SO₄ 50 g.L⁻¹, I = 1.06 M) in a similar reactor configuration and a comparable power uptake range (Fyferling et al., 2008) (Figure 26 c). The hold-up values during the culture were similar to the hold-up observed in non-coalescing medium at t = 0h (data not shown), increased to be 1.5 to 2 times higher than the hold-up values in ionic medium values for intermediate power uptake values (3,000 to 13,000 W.m⁻³) and finally match these values for e values (e > 25,000 W.m⁻³). The broth apparent viscosity and density increased during the culture up to 1.69× 10⁻³ Pa.s and 1016.40 kg.m⁻³ respectively due to the biomass accumulation (Figure 26 b and d). The broth rheological behaviour remained Newtonian. The supernatant apparent viscosity and density remained constants at 8.79 × 10⁻³ ± 5.01× 10⁻⁵ Pa.s and 1004.92 ± 0.97 kg.m⁻³ respectively. The broth and supernatant viscosity remained under 2× 10⁻³ Pa.s during the culture and therefore did not impact the gaseous transfer. The broth and tension surface (Figure 26 a)

were close to the values reported in the literature for microbial cultures (Fyferling et al., 2008; Popovic et al., 1983).

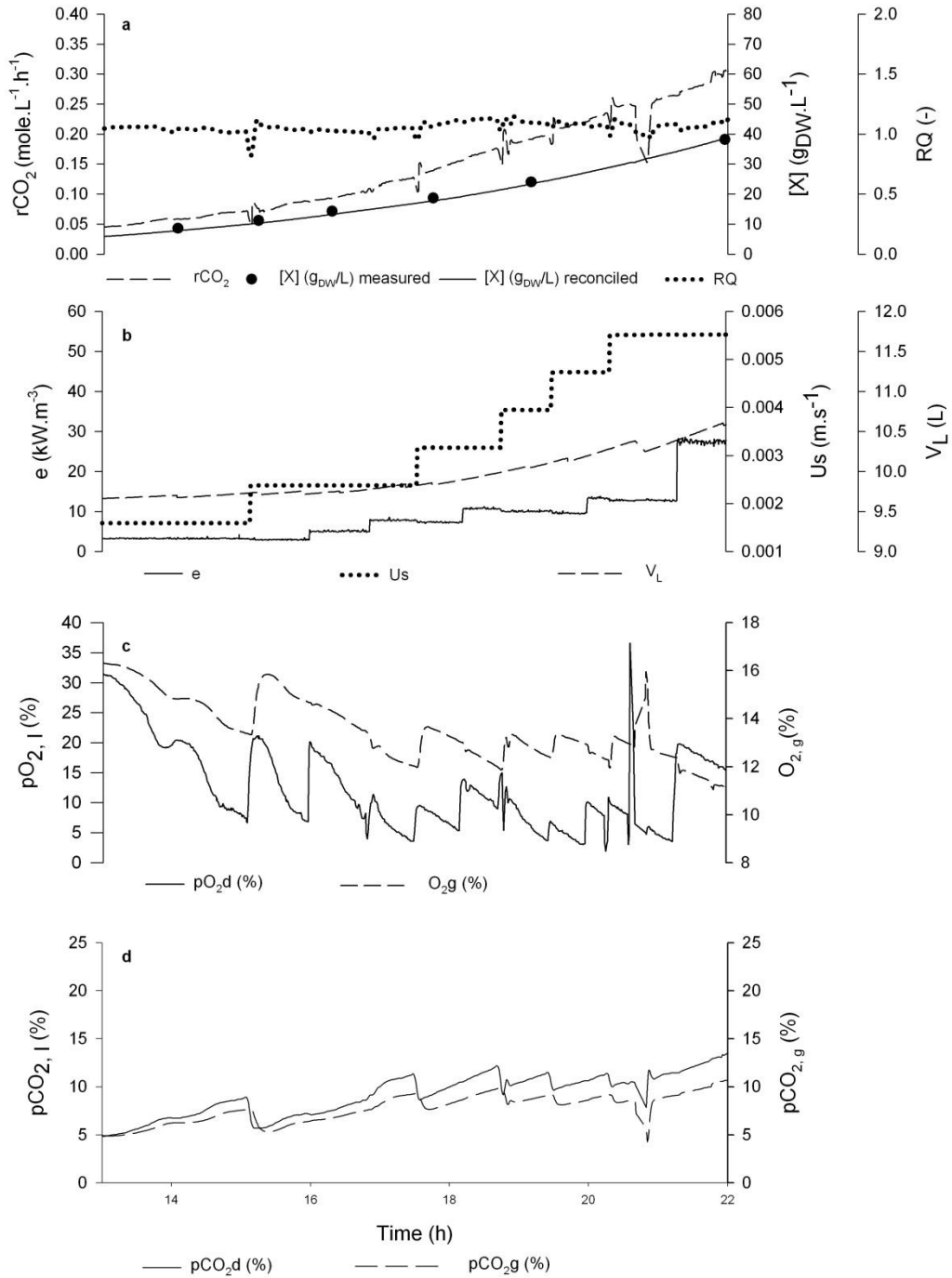


Figure 25. **a** Growth curves: biomass dry weight, CO₂ production rate and respiratory quotient **b** Culture operation: power uptake, superficial velocity, liquid phase volume **c** O₂ gas / liquid gradient: dissolved O₂ partial pressure normalized to the atmospheric pressure, molar fraction of O₂ in the exit gas **d** CO₂ liquid / gas gradient: dissolved CO₂ partial pressure normalized to the atmospheric pressure, CO₂ partial pressure in the exit gas.

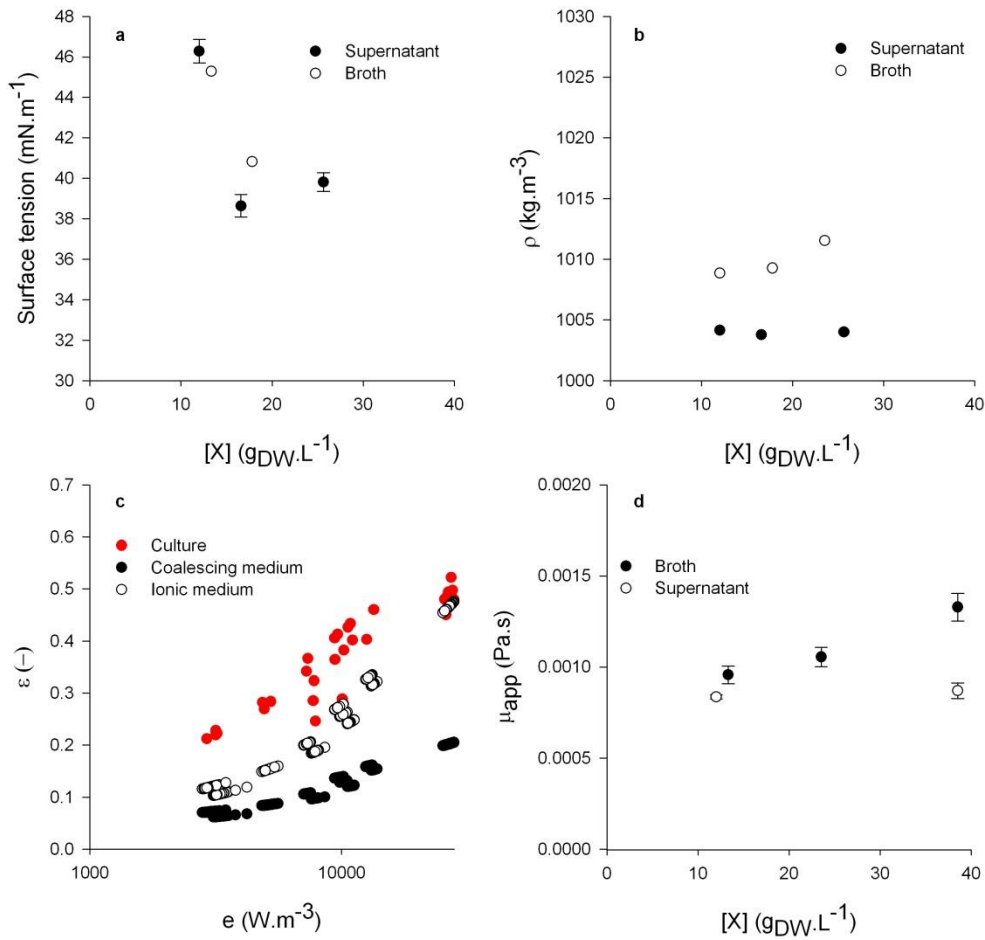


Figure 26. Evolution of the broth physico-chemical properties **a** surface tension **b** specific density **c** hold-up (Hold-up correlation for coalescing and non-coalescing media were established by (Fyferling et al., 2008) in similar conditions) **d** dynamic viscosity

3.3.4.3 O₂ gas / liquid and CO₂ liquid / gas transfer

The measurement of O₂ partial pressure in the liquid phase and in the exhaust gas allowed the quantification of the gas / liquid average gradient (Figure 25 c). The O₂ overall volumetric transfer coefficient calculated increased during the culture from 0.08 s⁻¹ to 0.48 s⁻¹ (Figure 27). These values are higher than those reported for classical O₂ gas/transfer studies (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009) but match values previously reported for intensive microbial cultures (Castan et al., 2002; Fyferling et al., 2008; Knoll et al., 2007; Preusting et al., 1993; Schaepe et al., 2013). The high O₂ overall volumetric transfer coefficient values are due to the use of a multi-turbines reactor (Gogate et al., 2000), to the partially non-coalescent nature of the fermentation broth (Fyferling et al., 2008) and to the high power uptake used throughout the culture to avoid oxygen limitation. Indeed, The dissipated power was 5 to 10 times higher than the values reported in the literature considering O₂ gas / liquid transfer in aerated stirred reactors (Garcia-Ochoa and Gomez, 2004; Garcia-Ochoa and Gomez, 2009; Linek et al., 1996; Linek et al., 2005) but of the

same order of magnitude than previously reported intensive microbial cultures (Fyferling et al., 2008; Knoll et al., 2007; Schaepe et al., 2013).

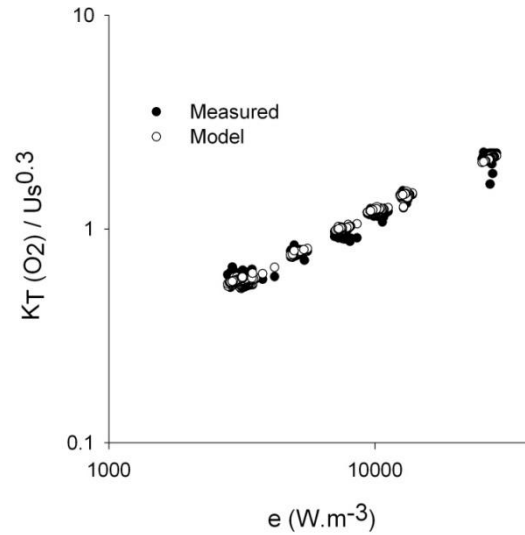


Figure 27. Evolution of the overall volumetric transfer coefficient for O₂ during the culture.

The O₂ overall volumetric transfer coefficient was correlated to the power uptake, the gas superficial velocity, the oxygen consumption and the antifoam addition through Equation 10.

$$K_T(O_2) = A \cdot e^\alpha \cdot \left(\frac{U_S}{V_{LB}}\right)^\beta \cdot r_{O_2}^\chi \cdot [Antifoam]^\delta \quad \text{Equation 192}$$

The modelled K_T was fitted to the observed K_T through a least squares method by adjusting the parameters A , α , β , χ and δ . The adjusted parameter values and the average absolute deviation between modelled and observed K_T values are displayed in Tableau 36. The contribution of the power uptake to the global $K_T(O_2)$ was higher than the contribution of aeration, showing that the dissipated power was the main factor impacting oxygen gas / liquid oxygen transfer, which matches reported empirical correlations (Garcia-Ochoa and Gomez, 2009).

Tableau 36. Empirical correlations for the observed volumetric transfer coefficients.

Gradient	A	α	β	χ	δ	Deviation (%)
$K_T(O_2)$	0.0048	0.5033	0.2991	0.1703	0.0169	3.7456

The theoretical excess factor ξ_{th} was calculated from $K_T(O_2)$ (Equation 184) (Royce and Thornhill, 1991). During the culture the $pCO_{2,1}$ was higher than the $pCO_{2,g}$ and the observed excess factor ξ_{obs} between the $pCO_{2,1}$ normalized to the atmospheric pressure and the $pCO_{2,g}$ reached 1.26 at $t = 22$ h (Figure 25 d). This CO₂ supersaturation was not expected from the literature description since the theoretical excess factor ξ_{th} was lower than the observed excess factor ξ_{obs} (Figure 28). Therefore, the observed CO₂ supersaturation in the liquid phase cannot be

explained by existing studies. The calculation of an overall volumetric transfer coefficient for CO_2 $K_T(\text{CO}_2)$ based on an average gradient would then yield values 10 to 20 times lower than the observed $K_T(\text{O}_2)$. Interestingly this result match several results previously reported for fermentation processes (Tableau 35) and model media (Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011). The $K_T(\text{CO}_2)$ should however be considered with caution as the calculated values may not represent a true gas / liquid transfer coefficient as explained previously in the present study.

Furthermore, one may note that the observed excess factor was strongly dependent of the gas superficial velocity as changes in the aeration flow rate triggered a sharp response of the excess factor (Figure 28). On the other hand the observed excess factor was almost independent of the power dissipation (Figure 28) as reported for model media studies (Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011).

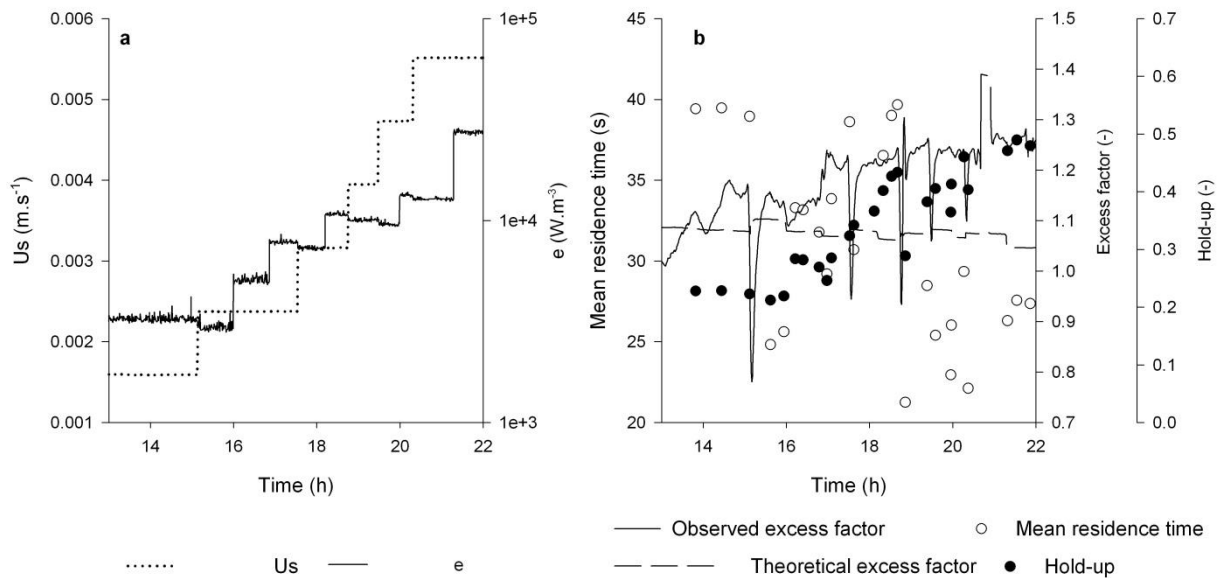


Figure 28. **a** Evolution of the power uptake and gas superficial velocity during the culture **b** Evolution of the observed and the theoretical CO_2 excess factor, hold-up, bubbles mean residence time, power uptake and gas superficial velocity during the culture

3.3.5 Discussion

The slow apparent CO_2 desorption and its strong dependency towards aeration have been underlined in some studies carried out in model media (Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011). These phenomena have been related to the saturation of ascending bubbles by CO_2 : once a bubble that is saturated cannot participate to the CO_2 stripping anymore (Sieblist et al., 2011). The bubbles mean residence times were calculated from the aeration flow rate and the liquid volume and were in between 20 and 40s during the culture (Figure 28 b). Therefore, our modelling work confirmed that for one bubble ascending the reactor the ratio between the

concentration in the bubble and the concentration in the liquid phase should eventually be close to unity (Figure 24). We calculated the CO₂ transfer rate (CTR) as described in (Sieblist et al., 2011) assuming mono-sized bubbles that were in equilibrium with the dissolved CO₂ at the exit of the broth (bubbles sizes were calculated using the correlations from (Alves et al., 2002)). The results showed that the CTR would be 2.7 to 5.6 times higher than the measured CO₂ production rate throughout the culture and thereby the excess factor would be close to one. Consequently, saturation of the CO₂ desorption capacity cannot explain on its own the high observed value of the excess factor. The valuable work of (Sieblist et al., 2011) was carried out in animal cell-culture conditions and may not applied to yeast cultures where the dissipated power and superficial gas velocity reached are much higher. Existing studies on CO₂ liquid / gas transfer need to be extended in order to explain the high value of the CO₂ excess factor observed in the present work. We therefore explored the existence of a bubble size distribution in the stirred tank reactor and its influence on the CO₂ excess factor.

3.3.5.1 Bubble size distribution

The impact of bubble size on CO₂ removal had been previously investigated (Gray et al., 1996; Sieblist et al., 2011) but calculations were carried out using mono-sized bubbles. Experimental measurements of bubbles size in aerated stirred reactors have shown that bubbles diameters are not uniform and that the bubble size distributions (BSD) are not symmetric (Barigou and Greaves, 1992; Laakkonen et al., 2005; Machon et al., 1997). A bubble size distribution for the dispersed bubbles was considered and modelled through a log-normal density probability function as previously reported for stirred tank reactors (Cents, 2003; Machon et al., 1997) (detailed in section 3.2.2). As the bubble residence time was size-dependent (Cents et al., 2005) and under a steady-state assumption for the BSD of the dispersed bubbles, the BSD created by stirring and aeration would be different from the actual dispersed BSD (dispersed gas phase) but similar to the BSD of the bubbles leaving the reactor (exhaust gas phase). The generated /exhaust BSD was characterized by the mean bubble size and the bubble size skewness. The skewness parameters describes the extend of the BSD asymmetry. For a given generated /exhaust BSD the evolution of pCO_{2,g} and pO_{2,g} in the ascending bubbles can be calculated using the mass transfer model previously described (detailed in section 3.2.1) which means that both O₂ gas / liquid transfer and CO₂ liquid / gas transfer were considered in the calculations. By integration over the whole BSD one yields the exhaust gas composition and can then calculate the resulting CO₂ excess factor (detailed in section 3.2.2).

The ratio between the concentration in the exhaust gas phase and the concentration in the liquid phase were calculated for each bubble radius in an asymmetric generated /exhaust BSD (Figure 29). The results for CO₂ showed that the small bubbles, with a high residence time but representing a small fraction of the total BSD volume, were at equilibrium with the liquid phase. On the contrary large bubbles, with a low residence time but representing a large fraction of the total BSD volume, were not at equilibrium and the higher the bubble size, the higher the CO₂ liquid / gas transfer gradient. A similar conclusion can be made for oxygen absorption but the critical diameter for effective transfer was lower than for CO₂ due to the lower solubility. These results are consistent with those reported for a study on CO₂ absorption and O₂ desorption in a non biological medium (Cents et al., 2005). Consequently, bubbles contribution to the total CO₂ liquid / gas transfer strongly depended on their size and the BSD is then a key factor when dealing with CO₂ liquid / gas transfer. For a given mean bubble diameter, if the generated /exhaust BSD skewness value was low (mono-sized bubbles as in (Sieblist et al., 2011) or normal distribution) the dispersed BSD would be similar to the exhaust BSD, the excess factor would be close to unity and therefore the CO₂ supersaturation in the liquid phase would be very small (Figure 30 B). On the other hand if the generated /exhaust BSD skewness increased, the dispersed BSD and the exhaust BSD would be quite different and the excess factor would be higher (Figure 30 A). Therefore, this work reveals that the existence of an asymmetric BSD in a stirred tank reactor may cause CO₂ supersaturation despite high O₂ transfer performances. The remaining point is to estimate the BSDs that were present during the fed-batch culture in order to explain the CO₂ excess factor observed during this intensive microbial process.

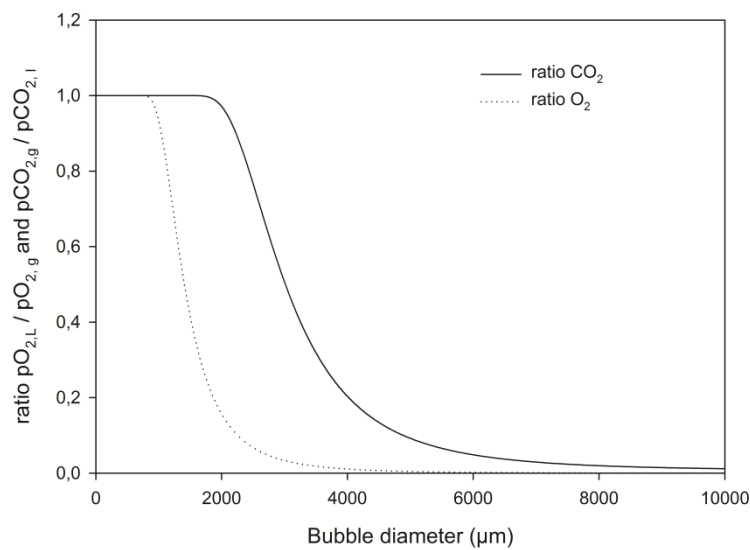


Figure 29. Evolution of the ratio between the partial pressure in the exhaust gas phase and the partial pressure in the liquid phase for a BSD with 200 μm mean diameter bubble and 4.75 skewness.

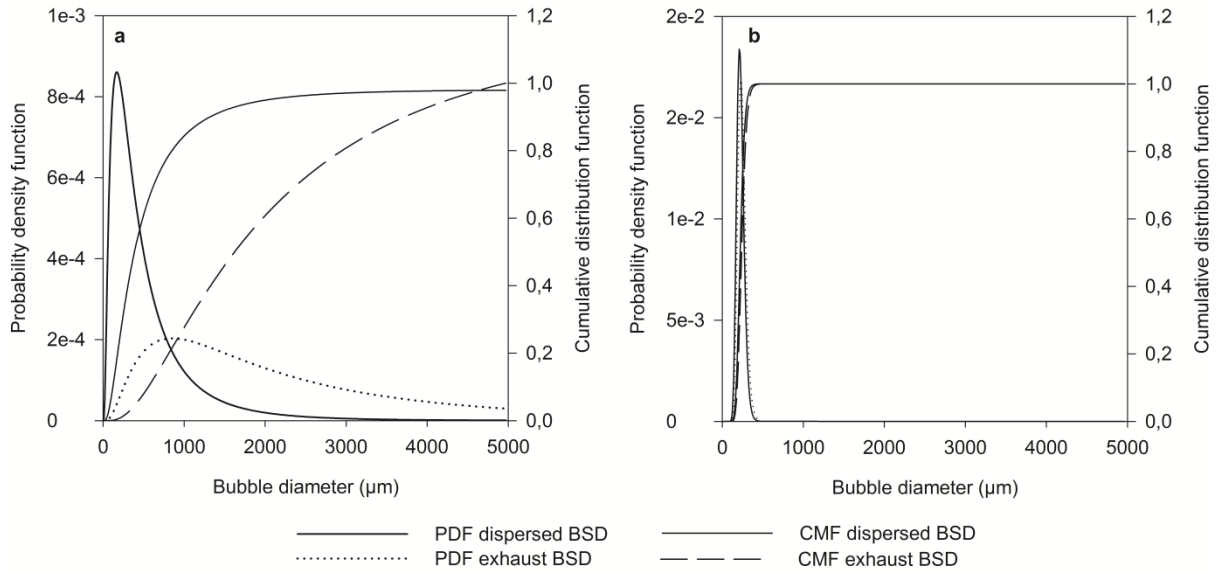


Figure 30. Comparison of a normal and an asymmetric bubble size distribution **a** Evolution of the probability density function (PDF) and the cumulative distribution function (CDF) of the exhaust BSD flow rate and dispersed BSD flow rate in case of an asymmetric BSD (mean bubble diameter: 200 μm, skewness value: 4.74, excess factor 1.10) **b** Evolution of the probability density function (PDF) and the cumulative distribution function (CDF) of the exhaust BSD flow rate and dispersed BSD flow rate in case of a symmetric BSD (mean bubble diameter: 200 μm, skewness value: 0.61, excess factor 1.00).

3.3.5.2 Bubble Size Distribution parameter estimation during the culture

From xO_2 , xCO_2 , $pCO_{2,g}$ and $pCO_{2,l}$, gas flow rate and hold up measurements and using an optimization algorithm it was possible to estimate the BSD mean diameter and skewness that make the simulated and the observed O_2 and CO_2 fluxes during the culture fit (Figure 31). The calculations are detailed in supplementary material 2. The results showed that an asymmetric bubble size distribution would explain both the CO_2 excess factor and the $K_T(O_2)$ observed during the culture i.e. both the low CO_2 liquid/gas transfer and the high O_2 gas / liquid transfer. The estimated BSDs were positively skewed as observed in measured BSDs in stirred tank reactors (Barigou and Greaves, 1992; Laakkonen et al., 2005; Laakkonen et al., 2007; Machon et al., 1997). The calculated skewness values were in the same order of magnitude than the skewness calculated from a previously estimated logarithmic-normal BSD in a stirred tank reactor : ≈ 7 for $e = 7000 \text{ W.m}^{-3}$ in (Machon et al., 1997). The broad distribution was also consistent with experimental data as it was reported that 40% of the observed bubbles were in between 40 μm and 300 μm diameter in a STR operated at 1 kW.m^{-3} and 1 vvm although a few bubbles as large as 5 and 2 mm diameter were still observed in coalescing and non-coalescing media respectively (Machon et al., 1997).

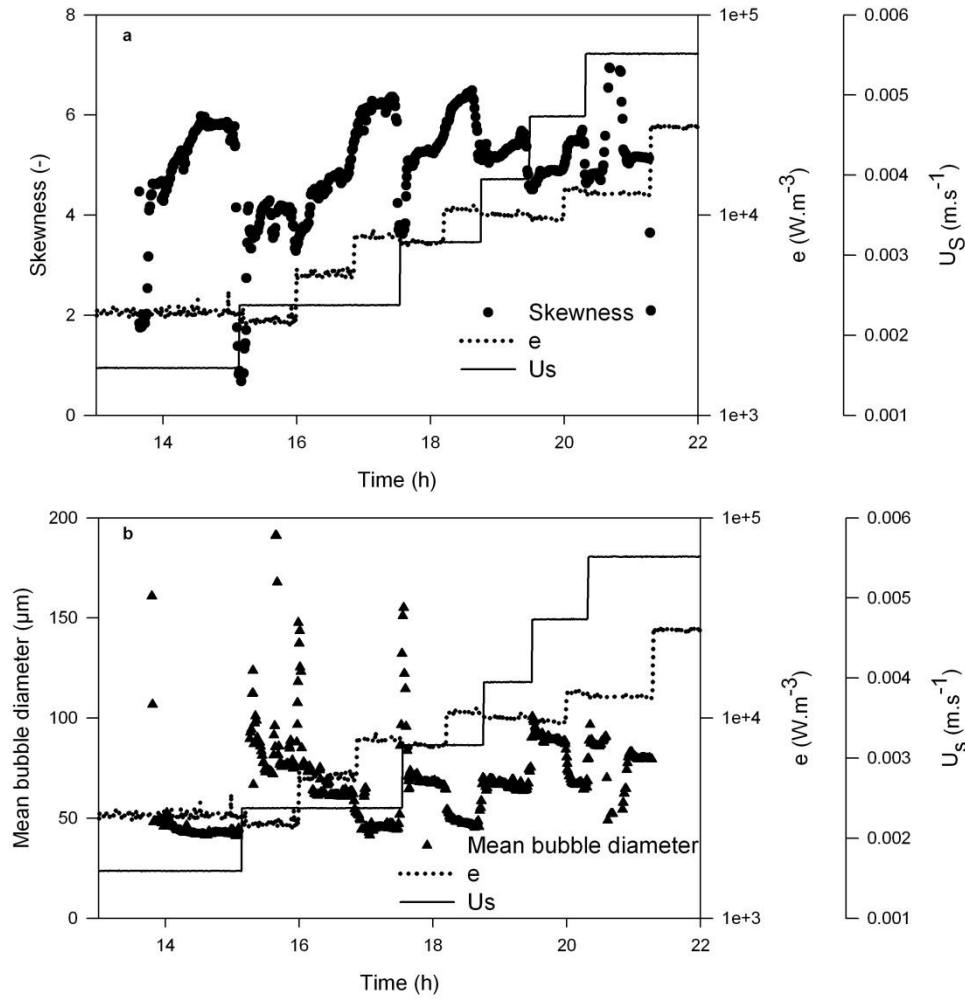


Figure 31. Details of the evolution of the estimated skewness (a) and bubble mean diameter (b) of the fitted bubble size distribution throughout the fed-batch culture.

The estimated skewness and mean bubble diameter of the fitted BSD were dependent of the power uptake and gas superficial velocity (Figure 31). Increasing the gas superficial velocity triggered a decrease of the estimated skewness and a rise of the computed mean bubble diameter. A rise of U_S decreased the bubble mean residence time and would then increase the replacement rate of the CO₂ saturated bubbles, decrease the gas phase volume that is at equilibrium with the liquid phase and change the dispersed BSD as the residence time of small bubbles may be reduced. On the other hand the fitted BSD skewness and the hold-up increased and the bubble mean diameter decreased with higher dissipated power. Experimental observations on the influence of the stirring rate and the gas flow rate on local BSDs profiles in STR using Capillary Probe Suction and Optical Imaging techniques can be found for coalescing media and low power uptake, aeration rate and hold-up. No clear impact of the stirring rate and aeration rate on local number BSDs profiles were related in (Laakkonen et al., 2005) whereas this impact strongly

depended on the position within the reactor in (Barigou and Greaves, 1992). No data using non-coalescing medium and high power uptake and aeration rate could be found for comparison with the present work.

The power uptake and gas superficial velocity have opposite effects on the BSD skewness and mean bubbles diameter. However these parameters both increased the $K_L(O_2)$ with a prominent effect of the power uptake (Figure 27; Tableau 36) that was not observed for the CO_2 excess factor (Figure 28). For given U_s et e , the calculated mean bubble diameter was constant. Meaning while an increase of BSD skewness could be observed (as between 16.30 h and 16.85 h for instance). These variations could not be explained by the evolution of the broth rheological parameters (Figure 26) but might be caused by an impact of increasing biomass concentration at the gas / liquid interface as reported in (Galaction et al., 2004). Transfer phenomena in microbial cultures may be impacted by the biological activity and further characterization of the influence of cells on these phenomena should be carried out.

3.3.6 Conclusion

The aim of the present work was to investigate the CO_2 liquid / gas transfer during an intensive aerobic microbial culture where a high CO_2 supersaturation was observed in the fermentation broth but could not be explained by existing studies.

We pointed out that O_2 counter diffusion must be considered when investigating CO_2 liquid / gas transfer and that the CO_2 liquid / gas gradient was bubble size dependent. We revealed out that an asymmetric bubble size distribution may cause the high CO_2 supersaturation observed in the fermentation broth despite high O_2 transfer performances. We finally calculated the BSD skewness and the mean bubble diameter evolution during the culture as a support to this theory and discussed their dependency towards power uptake and superficial gas velocity.

This work contributes to a better understanding of CO_2 liquid / gas transfer in stirred aerated reactors and points out the impact of the bubble size distribution on gaseous transfer. It may therefore be of interest for scale-up of microbial processes where the volumetric transfer coefficient is frequently used as a physical scale-up variable (Schmidt, 2005). Furthermore this work may also be relevant for physiology studies conducted in bioreactors as high CO_2 concentration in the fermentation broth had previously been shown to deeply impact microorganism's physiology and then the process quality (Aguilera et al., 2005b).

3.4 Récapitulatif des résultats

- Le transfert croisé gaz / liquide pour l'O₂ et liquide / gaz pour le CO₂ a été investigué par la construction d'un modèle de transfert de matière permettant de déterminer l'évolution des concentrations en O₂ et CO₂ dans une bulle de gaz en ascension dans le fermenteur. Il a ainsi été possible de montrer qu'en conditions de culture microbienne le transfert liquide / gaz du CO₂ est plus rapide que le transfert gaz / liquide de l'oxygène en raison d'un gradient de concentration liquide / gaz du CO₂ plus élevé que le gradient gaz / liquide de l'O₂ alors que les coefficients de transfert sont globalement équivalents (section 1.3.7.1). Pour des bulles de faible taille le transfert liquide / gaz du CO₂ pourrait alors s'inverser au cours de l'ascension. Dans ces conditions le calcul d'un coefficient volumique global de transfert liquide / gaz du CO₂ serait impossible.
- Le transfert croisé gaz / liquide pour l'O₂ et liquide / gaz pour le CO₂ a ensuite été investigué expérimentalement pour la première fois dans la littérature au cours d'une culture microbienne intensive. Une culture discontinue alimentée de *S. cerevisiae* en métabolisme oxydatif a été réalisée et des performances très élevées ont été atteintes pour le transfert d'oxygène ($K_T(O_2)$ jusqu'à 0.38 s⁻¹) en raison notamment de l'application d'une puissance dissipée élevée (ϵ jusqu'à 27914 W.m⁻³). Au vu de ces performances de transfert le facteur d'excès de la pression partielle en CO₂ dissous dans la phase liquide par rapport à la pression partielle en CO₂ dans la phase gaz devrait être proche de l'unité. Or le facteur d'excès mesuré augmente au cours de la culture jusqu'à atteindre 1.26 à $t = 22$ h. En conditions de culture microbienne intensive le CO₂ est en sursaturation dans la phase liquide ce qui ne peut être expliqué par l'approche théorique de (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977) ni par la saturation des bulles par le CO₂ comme décrit par (Sieblist et al., 2011).
- Des mesures directes de tailles de bulles rapportées dans la littérature ont conduit à suspecter l'existence d'une hétérogénéité de la phase dispersée (Barigou and Greaves, 1992; Laakkonen et al., 2005; Machon et al., 1997). Un modèle de distribution de tailles de bulles et donc des temps de séjour associés a été construit et utilisé avec le modèle de transfert de matière déjà décrit. Il a alors été proposé que l'existence d'une distribution asymétrique de type log-normale des tailles de bulles dans le réacteur pouvait expliquer l'existence d'une sursaturation en CO₂ dans le moût de fermentation sans remettre en cause le mécanisme diffusionnel de désorption du CO₂.

- Les paramètres caractéristiques de l'hétérogénéité de la phase gaz (diamètre arithmétique des bulles et coefficient d'asymétrie) ont été estimés au cours de la culture à partir des mesures de concentration en O_2 et CO_2 dans la phase liquide et la phase gaz. Les diamètres arithmétiques des distributions de tailles de bulles au cours de la culture sont faibles ($<100\mu m$) et les coefficients d'asymétrie correspondants sont élevés (4-6) ce qui est cohérent avec les observations rapportées dans la littérature (Machon et al., 1997).
- La conclusion principale de ce travail est que l'estimation de la concentration en CO_2 dans le moût de fermentation à partir de la mesure de la fraction en CO_2 dans les gaz de sortie est impossible sans une connaissance exacte de la distribution des tailles de bulles constituant la phase dispersée dans le réacteur. L'approche classique décrite dans (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977) et détaillée dans la section 1.3.7.1 est donc invalidée pour des conditions de culture microbienne intensive. Seule une mesure directe de la concentration en CO_2 dissous permet d'avoir accès à la valeur de cette variable.

4. Etude de la réponse à court-terme et à long-terme de *S. cerevisiae* à des
incréments de la concentration en dioxyde de carbone dissous

4.1 Introduction

Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article scientifique paru dans le journal « Process Biochemistry » (Richard et al., 2014).

De nombreux travaux ont été consacrés à l'impact du dioxyde de carbone sur la physiologie des micro-organismes et en particulier pour la levure *S. cerevisiae*. Néanmoins peu d'études proposent une évaluation quantitative de l'impact du CO₂ (Aboka et al., 2012; Aguilera et al., 2005b; Chen et al., 1976; Krook et al., 2004; Kuriyama et al., 1993).

Bien que donnant des informations quantitatives de qualité ces études pourraient être plus informatives pour comprendre l'impact du CO₂ sur la physiologie de *S. cerevisiae* si l'environnement gazeux était mieux cerné. En effet la concentration en CO₂ dissous n'est pas directement mesurée mais estimée à partir de la mesure de la fraction molaire en CO₂ dans les gaz de sortie. Or les résultats du chapitre 3 nous ont permis de montrer que cette démarche pouvait potentiellement entraîner une sous-estimation de la concentration en CO₂ dissous dans le moût. Il apparaît donc préférable d'utiliser une mesure directe de la concentration en CO₂ dissous dans le cadre d'une étude de l'impact de ce composé sur la physiologie d'un micro-organisme. De plus, les auteurs proposent peu d'hypothèses physiologiques aux phénomènes observés et les mécanismes d'action du CO₂ sont toujours peu connus.

La stratégie adoptée dans cette étude est de mettre en œuvre des cultures continues de la levure *S. cerevisiae* avec une mesure directe de la concentration en CO₂ dissous et de les soumettre à différents incréments de concentration de ce composé. Les réponses à court-terme et / ou à long-terme de la levure à ces échelons sont analysés et discutés selon les différentes hypothèses pouvant être émises sur les mécanismes d'action du CO₂ sur la levure.

4.2 Publication

Quantification of the transient and long-term response of S. cerevisiae to carbon dioxide stresses of various intensities.

Lannig Richard¹²³, Stéphane E. Guillouet¹²³⁴, Jean-Louis Uribe Larrea¹²³.

¹ Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Av. de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

² INRA, UMR792, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France.

³ CNRS, UMR5504, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse F-31400, France.

⁴ Corresponding author at Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés – INSA, UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France. Email adress : stephane.guillouet@insa-toulouse.fr. Phone : +335 61 55 94 47.

Authors' contribution

SG and JLU defined the research theme.

LR, SG and JLU designed the experiments.

LR carried out the fermentation experiments, the laboratory work and analysed the data.

LR, SG and JLU wrote the paper.

All authors have read and approved the manuscript.

4.2.1 Abstract

Carbon dioxide (CO₂) is a major compound of microbial metabolism both as a substrate and as a product but high dissolved carbon dioxide concentrations have long been known to affect yeast physiology.

This work investigates the energetic aspects of the transient and long-term responses of yeast chemostat cultures submitted to different step-increases of the dissolved CO₂ concentrations.

It was demonstrated that a CO₂ shift-up triggered a transient metabolic response characterized by an increase of the specific respiration rate (up to +37%), the mobilization of storage sugars, excretion of ethanol and acetate (up to 50 mg.L⁻¹) and by the uptake of potassium (+30 mM) and magnesium (+20 mM) ions. The energy generation by the yeast metabolism temporarily increased and a transient decrease in the biomass synthesis was observed. This short-term response was not dependent of the amplitude of the shift-up and could not be explained by pH homeostasis only. Moreover, on the long-run CO₂ created an energy drain that was proportional to its concentration as the Y_{ATP} value decreased from 12.7 g_X.mole_{ATP}⁻¹ to 9.97 g_X.mole_{ATP}⁻¹ when the dissolved CO₂ concentration was increased from 1.4 mM to 17.09 mM. Succinate excretion was also observed for CO₂ enriched cultures and its production rate was found proportional with increasing CO₂ concentrations. Finally, we pointed out that yeast cells may adapt to high CO₂ concentrations in the long-run.

This work illustrates the regulation of physiologic and metabolic homeostasis of yeast cells when facing CO₂ stress.

Keywords : Dissolved carbon dioxide, *S. cerevisiae*, carbon dioxide stress, chemostat

4.2.2 Introduction

Carbon dioxide is a major compound of the yeast metabolism both as a substrate and as a product. Dissolved carbon dioxide (CO_{2,l}) is produced by decarboxylation reactions (such as TCA or during ethanol formation) and both CO_{2,l} and bicarbonate ions are required for yeast growth (Aguilera et al., 2005a). The dissolved carbon dioxide concentration in the broth depends on the CO₂ production rate by the yeast metabolism, on the chemical equilibrium with bicarbonate ions in the liquid phase and on the CO₂ liquid / gas transfer rate. CO₂ may then accumulate in the fermentation broth and impact the yeast physiology.

It has long been known that high dissolved carbon dioxide concentrations have an inhibitory effect on yeast physiology (Jones and Greenfield, 1982) and high pressure carbon dioxide (H.P.C.D) is used for microorganisms inactivation in dairy products (Dixon and Kell, 1989; Garcia-Gonzalez et al., 2007; Zhang et al., 2006). Carbon dioxide influence on yeast metabolism has been studied in fermentative metabolism (Aguilera et al., 2005b; Karl et al., 1997; Kuriyama et al., 1993; Renger, 1991; Thibault et al., 1987), oxido-reductive metabolism (Aguilera et al., 2005b; Belo et al., 2003; Campelo and Belo, 2004; Kuriyama et al., 1993; Nagahisa et al., 2005; Otero Romero, 2009) and oxidative metabolism (Aboka et al., 2012; Aguilera et al., 2005b; Chen et al., 1976; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a). Biomass growth, fermentative capacity and in some case product formation are affected by CO₂ although this impact varies greatly depending on the strain, on the cultivation mode (batch, fed-batch, continuous) and on the yeast metabolism. Oxido-reductive and oxidative metabolism appear to be much more sensitive to CO₂ than fermentative metabolism (Aguilera et al., 2005b; Kuriyama et al., 1993). Although works have been carried out on CO₂ impact on yeast, there is paradoxically few quantitative data available since most of the mentioned studies were conducted using complex media, in non or poorly controlled environments or using CO₂ concentrations much higher than the range usually found in microbial cultures.

Some studies conducted in tightly controlled conditions and /or using synthetic media are nevertheless available (Aboka et al., 2012; Aguilera et al., 2005b; Baez et al., 2009; Chen et al., 1976; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a). The reduction in the biomass yield reached 54% for a CO_{2,1} concentration of 25.45 mM in an aerobic carbon – limited fed-batch culture (Chen et al., 1976) and 24% for a CO_{2,1} concentration of 22.30 mM in an aerobic carbon – limited chemostat culture (Aguilera et al., 2005b). Higher specific respiration rates (+74%) were also observed in the latter case. The short-term response of yeast to CO₂ has been studied by a stimulus-response strategy that revealed that a step increase of CO_{2,1} concentration triggered a transient increase of the respiratory activity linked to the mobilization of storage sugars (Aboka et al., 2012; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a).

Several mechanisms have been thought to contribute the CO₂ toxicity such as an “anesthesia” disturbing effect on the fluidity of the cellular membrane (Garcia-Gonzalez et al., 2007; Isenschmid, 1995), a decrease in the intracellular pH (Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Kresnowati et al., 2008a; Mashego, 2005a; Orij et al., 2011; Orij et al., 2012), a mass-action effect on metabolic reactions or a direct inhibition of the activity or the synthesis of key enzymes (Garcia-Gonzalez et al., 2007; Jones and Greenfield, 1982). CO₂ is highly soluble in cellular membrane, as revealed by a water / octanol partition coefficient of 1.3 and experimental studies

on model membranes (Simon and Gutknecht, 1980; Spilimbergo et al., 2002). CO₂ accumulation in membranes may modify the membrane lipid and fatty acid composition (Castelli et al., 1969) and then alter the cellular membrane functions (Isenschmid, 1995). However this effect is not likely to explain the CO₂ inhibitory effect as this effect should then affect the yeast physiology with the same extend in fermentative and oxidative metabolisms contrary to what was observed in controlled cultures (Aguilera et al., 2005b). Furthermore, inhibition of metabolic reactions by CO₂ or bicarbonates either directly (mass-action effect) or indirectly (inhibition of the activity of the enzyme catalyzing the reaction) remains hypothetical due to the difficulty of measuring intracellular metabolites in dynamic culture conditions (Canelas et al., 2009) and enzyme activity in intracellular – like environments (van Eunen et al., 2010). Moreover, the impact of CO₂ on intracellular pH of microorganisms has been mentioned in numerous papers (Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Kresnowati et al., 2008a; Mashego, 2005a; Orij et al., 2011; Orij et al., 2012) but has hitherto not been experimentally proved or assessed on a quantitative basis. Finally, investigation of CO₂ impact on the transcriptome of *S. cerevisiae* in chemostat reveals significant changes in the transcription of genes encoding mitochondrial functions in aerobic glucose or nitrogen limited chemostats (Aguilera et al., 2005b). Unfortunately the authors could not relate these changes to the action of the CO₂ on the yeast physiology except for NCE103 coding for a putative carbonic anhydrase (Aguilera et al., 2005a; Aguilera et al., 2005b). Consequently, to date none of the mentioned mechanisms has been proved to explain the CO₂ inhibitory effect either in culture conditions or in H.P.C.D treatments.

The aim of the present study was to further investigate the impact of CO₂ upshift on the yeast short-term and long-term response using a quantitative physiology approach based on the stimulus-response strategy (Spadiut et al., 2013). To this end, aerobic carbon-limited chemostat cultures were carried out and submitted to step increases of the CO_{2,1} concentrations of different intensities.

4.2.3 Material and methods

4.2.3.1 Reactor setup

Cultures were carried out in a stainless-steel 7.0 L bioreactor (B.Braun AG, Melsugen, Germany) with a working volume of 2.0 L. The reactor was jacketed, had a concave bottom, an inner diameter of 16.6 m and four 0.23 m height baffles. It was equipped with one O-ring sparger located at the bottom and 2 six bladed Rushton impellers (external diameter 6.3 cm, 1.5 cm

width) placed at 1 and 5.5 cm from the bottom end of the stirring shaft and driven by a 340 W motor. Mass – flow controllers (5850 TR model, Brooks, USA) were used to control the inlet air and CO₂ flow rates.

The temperature was kept at 30.0 °C and the pH was regulated at 5.00 by addition of 2 N NaOH solution. The relative pressure was kept at 0.1 or 0.3 bars. The reactor was equipped with a foam detection system (Sartorius, Germany) and foam formation was controlled by the addition of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, USA). Monitoring and regulation of the variables were carried out using MFCS/ win 2.0 software (Sartorius, Germany).

4.2.3.2 On-line measurements

Inlet and outlet gas composition were measured using mass spectrometry (Prima 600s model, ThermoFisher, U.K). Analysis was performed every 10s and the time delay between the outlet of the reactor and the gas analyzer was considered in the calculations.

pH was measured using a 32.7 cm vertical probe (Mettler-Toledo, Switzerland). The dissolved O₂ partial pressure, expressed as a percentage of oxygen saturation in the initial medium at operating pressure and temperature, was measured using an 12 cm InPro6800 probe (Mettler-Toledo, Switzerland) located 5.7 cm above the bottom at an inclination of 15°. The dissolved CO₂ partial pressure, expressed as a percentage of CO₂ saturation in the initial medium at operating pressure and temperature, was measured using an 12 cm InPro5000 (Yellow Spring Instrument, USA) located 5.7 cm above the bottom at an inclination of 15°. Data from the pH, dissolved oxygen and carbon dioxide were recorded every second during the pulses experiments. The time constants of the dissolved oxygen and carbon dioxide probes were identified measuring the probe responses to dissolved concentration step increases and decreases at 30.0°C in water and fitting the observed responses with a first order model following a least-squares criteria (Taymaz-Nikerel et al., 2011). The time constant of the probes at 30.0°C were estimated to be 13.88 s and 209 s for InPro6800 and InPro5000 respectively. The raw signals from the probes were corrected using the corresponding response times. The dissolved CO₂ probes slightly drifted in A-SS2, B-SS1 and B-SS4: the dissolved CO₂ concentration in the corresponding steady-states was therefore estimated from the CO₂ mole fraction in the exit gas.

4.2.3.3 Analytical procedures

Supernatant sampling was carried out using a cross-flow filtration unit (Applikon, The Netherlands) and a fraction collector (Fraction Collector Frac-100, Pharmacia fine chemicals, USA) set up in an external recirculation loop operated with a peristaltic pump (Masterflex 77521-57, Cole-Parmer USA). Broth sampling was carried out using a syringe.

Dry cell weight measurements were carried out by filtering a known volume of broth on a 0.45 µm pore-size polyamide filter and drying it to a constant weight at 60°C under a partial vacuum (0.260 bars) during 48h. The biomass composition formula used in the calculations was determined to be $C_1H_{1.789}O_{0.531}N_{0.1602}P_{0.018}S_{0.003}$ (Service Central d'Analyse du C.N.R.S, Villeurbanne, France) with 6% ashes corresponding to a molar weight of 25.84 g.Cmole⁻¹.

Glucose and ethanol concentrations in the feed were determined using H.P.L.C as described in (Alfenore et al., 2002). Glucose, ethanol and acetate concentrations were determined spectrophotometrically using commercial enzymatic kits: (Glucose assay kit, Sigma Aldrich, USA) for glucose and (R-Biopharm, Germany) for ethanol and acetate.

Errors bars for glucose, ethanol and acetate concentrations represent the standard deviation of duplicate analysis of the same sample.

Glycogen and trehalose intracellular concentrations were determined according to (Parrou and François, 1997). Error bars for glycogen concentration represent the standard deviation of technical duplicates of independent samples

Cell mean diameter was measured as the mean FSC-A of at least 38,000 events using a BD Accuri C6 flow cytometer (BD Biosciences, USA). The device was calibrated using polystyrene microspheres from 1 to 15 µm (Molecular probes, USA). The intracellular water content was measured using thermogravimetry as described in (Uribelarrea et al., 1985).

Potassium and magnesium concentrations in the liquid phase of the fermentation broth were determined using full quantitative inductively coupled plasma atomic emission spectroscopy (Agilent 7700 series, Agilent Technologies, USA). Supernatant samples were diluted 1/100 using 1% (w/w) nitric acid and filtered (0.22 µm pore size, Sartorius, Germany). Indium was used as an internal standard. Potassium and magnesium intracellular concentrations were calculated from their respective dynamic mass balances over the liquid phase (Equation 193) and the biomass phase (Equation 194). The biomass volume V_x was calculated from the biomass concentration (g_x.L⁻¹) and the intracellular volume (L_x.g_x⁻¹) obtained from thermogravimetry measurement. The errors bars for the K⁺ and Mg²⁺ concentrations correspond to the absolute error of five analysis replicate of the same sample.

$$V_l \times \frac{d[E_l]}{dt} = Q_l \times E_l^{in} - Q_l \times E_l - \Phi \quad \text{Equation 193}$$

$$V_l \times \frac{d[E_x]}{dt} + [E_x] \times \frac{dV_l}{dt} = \Phi - Q_l \times V_x \times [E_x] \quad \text{Equation 194}$$

4.2.3.4 Microorganism and media

The strain *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D was used in this work (van Dijken et al., 2000).

The following medium was used in all batch and chemostat cultures (concentrations expressed in g.L⁻¹) : glucose, 40.0 ; ethanol 2.0 ; (NH₄)₂SO₄, 12.0 ; KH₂PO₄, 6.0 ; MgSO₄, 7H₂O, 2.0 ; Na₂EDTA, 3.3 x 10⁻²; ZnSO₄, 7H₂O, 9.0 x 10⁻³; MnCl₂, 4H₂O, 2.0 x 10⁻³; CoCl₂, 6H₂O, 6.0 x 10⁻³; CuSO₄, 5H₂O, 6.0 x 10⁻³; Na₂MoO₄, 2H₂O, 8.0 x 10⁻³; CaCl₂, 2H₂O, 9.0 x 10⁻³; FeSO₄, 7H₂O, 6.0 x 10⁻³; H₃BO₃, 2.0 x 10⁻³; d-biotin, 4.0 x 10⁻³; D-L pantothenic acid, 4.0 x 10⁻³; nicotinic acid, 4.0 x 10⁻³; myo-inositol, 50 x 10⁻³; thiamine hydrochloride, 4.0 x 10⁻³; pyridoxine hydrochloride, 4.0 x 10⁻³; para-amino benzoic acid, 0.8 x 10⁻³, ampicillin 50 x 10⁻². Chemicals were of the highest analytical grade available. Ethanol was added as a co-substrate (0.065 Cmol_{ethanol}·Cmol_{glucose}⁻¹) to avoid the occurrence of oscillations (Visser et al., 2002). The salt solution was prepared using tap water, the glucose, traces and vitamin and antibiotic solutions were prepared using osmosed water. The salt and glucose solution were sterilized by autoclave; the traces, vitamin and antibiotic were sterilized by filtration.

4.2.3.5 Rate calculation, mass balances and metabolic model.

The oxygen consumption rate rO₂ and carbon dioxide production rate rCO₂ were calculated from the mass balances of O₂ and CO₂ for both the liquid phase and the gas phase as described in (Sunya et al., 2012).

Pulse experiments may lead to small variations of the biomass concentrations that may not be accurately quantified using dry cell weight measurement (Taymaz-Nikerel et al., 2011). Therefore the transient total biomass formation rate was calculated from the carbon and degree of reduction balances as described by (Aboka et al., 2012; Sunya et al., 2012). Total biomass corresponds to the sum of the active biomass, trehalose and glycogen. The total biomass formation rate was calculated as the mean value of the two values calculated using the two balances (Aboka et al., 2012). Both values showed excellent agreement (data not shown). Variations of the total biomass degree of reduction value during the transient were neglected as reported in (Aboka et al., 2012). Glycogen and trehalose rates were calculated from their mass

balances as described by (Aboka et al., 2012) and integrated over time to yield the amount consumed during the transient. The data were checked for consistency (van der Heijden et al., 1994) and metabolic fluxes and Y_{ATP} values were calculated from the reconciled rates using a MFA model previously described (Pagliardini et al., 2010).

4.2.3.6 Chemostat and CO₂ step-increases experiments

The strain was cultivated in Petri dishes using YPD (Yeast extract 10 g.L⁻¹, Bacto-peptone 20 g.L⁻¹, D-glucose 20 g.L⁻¹) -agar medium. Pre-cultures were grown from a colony in 10 mL tube of YPD medium at 30.0°C for 12h on a rotary shaker (150 rpm). Each tube was transferred to a 1 L Erlenmeyer flask with 190 mL defined synthetic medium (pH 5.0) and was incubated at 30.0°C for 12h on a rotary shaker (150 rpm). This pre-culture was used to inoculate the reactor.

The culture was started on batch mode in aerobic conditions and the feed was started after reconsumption of ethanol. Cultures were considered to be in steady state after at least five residence times. The feed medium was supplied using a peristaltic pump (520-DU model, Watson-Marlow, U.K) and the feed reservoir weight was recorded (scale CH1NE-64E0-S, Sartorius, Germany). The chemostat cultures were performed on a weight-controlled mode at a dilution rate within the range 0.13 – 0.166 h⁻¹ to avoid the occurrence of oscillations. This high dilution rate was also chosen to avoid high storage sugars content in biomass (Sillje et al., 1999). The reactor weight was measured (scale CH1NE-64E0-S, Sartorius, Germany) and regulated at a constant value using a peristaltic pump (520-DU model, Watson-Marlow, U.K). Base addition was also monitored by weighing (scale CPA5201, Sartorius, Germany). The mass densities of the feed medium, the base solution and the broth were measured at 30.0°C using a DE40 densimeter (Mettler Toledo, Switzerland). The cultures were operated at 0.75 vvm and 1500 rpm (equivalent to a power uptake of 38.8 kW.m⁻³ according to (Hughmark, 1980)) to avoid oxygen limitation.

Step-increases in the dissolved CO₂ were performed by an increase of the CO₂ molar fraction in the inlet aeration gas achieved by mixing pure CO₂ to the air flow. Both pure CO₂ and air were controlled with mass flow controllers (5850 TR model, Brooks, USA). Consequently N₂ and O₂ molar fractions in the resulting inlet gas mix were lower than with air. There were no changes in the inlet gas flow-rate or the feed medium flow rate during the shift-up experiment. The short-term response of the yeast to the step increase in dissolved CO₂ concentration was monitored during three hours.

Three independent chemostat cultures were carried out in the present work (Figure 32).

- In chemostat A the steady-state culture A-SS1 was submitted to a shift-up of the $\text{CO}_{2,1}$ concentration via an increase in the CO_2 molar fraction in the inlet gas from 0.036 % to 14.92 % under a relative pressure of 0.3 bars (equivalent to +5.29 mM $\text{CO}_{2,1}$). The yeast transient response to this step-increase was monitored and a new steady-state A-SS2 was eventually reached. A similar shift-up (from 14.92 % to 29.98% under a relative pressure of 0.3 bars equivalent to + 5.34 mM $\text{CO}_{2,1}$) was then performed, followed after 77 min by another one (from 29.98% to 44.86% under a relative pressure of 0.3 bars +5.27 mM $\text{CO}_{2,1}$).
- In chemostat B we compared the yeast steady-states obtained i) in presence of elevated $\text{CO}_{2,1}$ concentration (44.29% CO_2 in the inlet gas under a relative pressure of 0.3 bars, equivalent to +15.71 mM $\text{CO}_{2,1}$): steady-state B-SS1 ii) in a non- CO_2 enriched culture: steady-state B-SS2.
- In chemostat C the steady-state culture C-SS1 was submitted to a shift-up of the $\text{CO}_{2,1}$ concentration via an increase in the CO_2 molar fraction in the inlet gas from 0.036 % to 9.89 % under a relative pressure of 0.1 bars (equivalent to +2.96 mM $\text{CO}_{2,1}$).

The response of the yeast cells to these increases of the dissolved CO_2 concentration were analyzed with a focus on the 3 hours after a step-increase (short-term response) and / or after a steady-state was reached (long-term response).

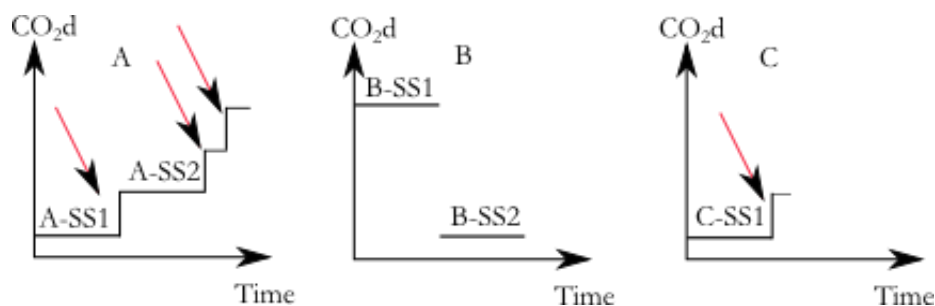


Figure 32. Overview of the steady-state chemostat cultures A, B and C carried out in the present work. The arrows represent the step-increases in the dissolved CO_2 concentration.

4.2.4 Results

4.2.4.1 Steady-state characteristics

The steady-state characteristics of the three chemostat cultures carried out in this work are shown in Tableau 37. A-SS1, B-SS2 and C-SS1 correspond to the steady-states without CO_2 enrichment; A-SS2 and B-SS2 correspond to the steady-states with CO_2 enrichment. Steady states were reached after at least five volume changes when no changes were observed in the dissolved O_2 and CO_2 concentrations, in the O_2 and CO_2 molar fractions in the exit gas and in the biomass

concentration. For all cultures carbon and degree of reduction balances were checked and were found to close within 5.5 %, indicating good data consistency. The data were reconciled according to (van der Heijden et al., 1994) and the difference between the calculated values and the reconciled values were under 3.5%. The respiratory coefficient was in between 0.945-0.991 in all cultures and only trace amounts of glucose, ethanol and acetate concentrations could be found (Tableau 37) confirming that the yeast metabolism was fully oxidative.

The steady-states reached with CO₂ enrichment (A-SS2 and B-SS1) were characterized by lower biomass yield, higher respiration rate, glucose consumption rate and ethanol consumption rate when compared with the corresponding steady-states in the absence of CO₂ (A-SS1 and B-SS2 respectively). The mean cellular diameter, the intracellular water content and the intracellular K⁺ concentration were close in the non-CO₂ enriched steady-states (A-SS1 and B-SS2) and the corresponding CO₂-enriched steady states (A-SS2 and B-SS1) (Tableau 37). Succinate production was observed only in both the CO₂-enriched steady states.

Mg²⁺ intracellular concentrations were slightly higher in the CO₂-enriched steady states (A-SS2 and B-SS1) than in the corresponding non-CO₂ enriched steady-states (A-SS1 and B-SS2).

Tableau 37. Comparison of steady states with or without carbon dioxide in the inlet gas mix.

SS	A-SS1	B-SS2	C-SS1	A-SS2	B-SS1
D (h⁻¹)	0.156	0.136	0.166	0.154	0.136
[CO_{2,i}] (mM)	1.489 ± 0.004	1.426 ± 0.018	1.312 ± 0.026	6.759 ± 0.017	17.198 ± 0.018
[X] (g_{DW}.L⁻¹)	20.887 ± 0.061	19.643 ± 0.713	20.690 ± 0.103	19.269 ± 0.083	17.003 ± 0.198
q_{glucose} (mmole.g_X⁻¹.h⁻¹)	- 1.607 ± 0.009	- 1.434 ± 0.052	- 1.730 ± 0.012	- 1.723 ± 0.012	- 1.661 ± 0.041
q_{ethanol} (mmole.g_X⁻¹.h⁻¹)	- 0.273 ± 0.022	- 0.301 ± 0.011	- 0.332 ± 0.004	- 0.310 ± 0.023	- 0.348 ± 0.005
q_{O₂} (mmole.g_X⁻¹.h⁻¹)	- 4.094 ± 0.092	- 3.810 ± 0.046	- 4.359 ± 0.045	- 4.832 ± 0.025	- 4.655 ± 0.027
q_{CO₂} (mmole.g_X⁻¹.h⁻¹)	4.053 ± 0.039	3.778 ± 0.065	4.270 ± 0.033	4.568 ± 0.037	4.587 ± 0.022
q_{succinate} (mmole.g_X⁻¹.h⁻¹)	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.000 ± 0.000	0.019 ± 0.001	0.082 ± 0.013
Carbon recovery (%)	99.01 ± 0.67	99.29 ± 0.71	97.28 ± 1.10	98.27 ± 0.34	95.62 ± 0.72
Redox recovery (%)	101.33 ± 1.95	100.51 ± 0.65	97.89 ± 0.69	103.48 ± 0.41	94.38 ± 0.41
RQ	0.989 ± 0.036	0.991 ± 0.016	0.980 ± 0.012	0.945 ± 0.009	0.9853 ± 0.017
R_{C,X} (Cmole_X.Cmole_C⁻¹)	0.590 ± 0.003	0.584 ± 0.021	0.599 ± 0.004	0.557 ± 0.003	0.505 ± 0.012
[Glucose] (mg.L⁻¹)	4.23 ± 2.53	0.05 ± 0.00	3.70 ± 0.38	1.12 ± 0.69	0.05 ± 0.00
[Ethanol] (mg.L⁻¹)	0.00 ± 0.00	1.84 ± 1.25	5.52 ± 0.87	1.61 ± 0.61	26.05 ± 11.30
[Acetate] (mg.L⁻¹)	0.41 ± 0.01	1.35 ± 0.43	2.08 ± 1.52	0.88 ± 0.09	2.41 ± 0.46
Cell diameter (µm)	5.698 ± 3.378	5.746 ± 3.349	N.D	5.503 ± 3.277	6.024 ± 3.454
Intracellular volume (mL_X.g_X⁻¹)	2.296 ± 0.041	N.D	1.443 ± 0.066	2.248 ± 0.210	2.257 ± 0.033
Intracellular [K⁺] (mM)	245 ± 14	251 ± 10	N.D	274 ± 11	251 ± 6
Intracellular [Mg²⁺] (mM)	37 ± 4	44 ± 3	N.D	41 ± 3	54 ± 2

N.D Non Determined

4.2.4.2 Short-term response to a single step-increase of the CO_{2,i} concentration

The yeast steady-state culture A- SS1 was submitted to a step-increase of 14.92 % of the CO₂ molar fraction in the inlet gas under 0.3 bars over pressure (equivalent to + 5.29 mM CO_{2,i}). This shift-up resulted in a rapid increase in the CO_{2,1} concentration from 1.489 mM to 7.359 mM and to a decrease in the dissolved oxygen concentration from 0.18 to 0.10 mM (Figure 33). The pH value did not change during the transient as the value stayed between 4.99 and 5.01 (data not shown).

Ethanol and acetate concentrations increased from low residual concentrations (<1 mg.L⁻¹) to 46 mg.L⁻¹ and 52 mg.L⁻¹ 24 min and 29 min after the shift-up respectively. These concentrations then decreased and returned to their respective steady state low value 47 min and 64 min. The residual glucose concentration remained low (<10 mg/L) during the transient. The corresponding specific rates q_{ethanol} , q_{acetate} and q_{glucose} were calculated from the respective mass balances in the liquid phase. The specific acetate rate was positive from the shift-up and reached a maximum at 13 min then acetate was fully reconsumed from 30 min to 65 min. Similarly the specific ethanol consumption rate followed the same pattern reaching a minimum at 17 min before increasing to values higher than the steady state value from 17 min to 50 min, indicating a transient reduction of ethanol consumption followed by the consumption of the accumulated ethanol.

The respiration rates increased instantaneously after the step-increase and peaked at 0.109 mole.L⁻¹.h⁻¹ (+ 27 %) for rO₂ 29 min after the shift-up and 0.103 mole.L⁻¹.h⁻¹ (+ 24%) for CO₂ 12 min after the shift –up and decreased to recover the steady state values at 65 min. The noisy profile of the respiration rates during the first minutes of the step-increases originated from the shift in the gas composition. An oscillatory behavior of the respiration rates was observed during the transient with a period of 70 min. The amplitude of the oscillation gradually decreased during the transient. These evolutions were reflected by similar evolutions of the specific respiration rates q_{O_2} and q_{CO_2} . The transient RQ value was between 0.86 and 0.96 and was therefore lower than the steady-state value.

The intracellular glycogen concentration decreased rapidly from the steady-state value of 1.2 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ to 0.75 at 7.5 min and 0.66 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ at 25 min. The corresponding glycogen specific rate changed from production ($q_{\text{glycogen}} = 0.18$ mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹) during the steady state to consumption during the first 20 min of the transient (q_{glycogen} down to - 3.69 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ 7 min after the shift-up). The intracellular glycogen concentration increased after 50 min although not recovering the steady-state value, which was reflected by a positive value of the glycogen specific rate. Intracellular trehalose

concentration was around $0.3 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1}$ at the start of the shift-up but was not measured during the transient.

The transient total biomass formation rate was calculated from the carbon and degree of reduction balances. The results showed that it decreased during the first 20 first minutes of the pulse experiment before slowly returning to the steady-state value following an oscillating pattern. The intracellular magnesium concentration instantaneously increased from 41 to 50-60 mM during the transient. The intracellular potassium concentration increased from 270 mM to 300 mM 29 min after the shift-up and subsequently decreased down to 244 mM 92 min after the step-increase. Therefore the intracellular potassium and magnesium concentrations followed different patterns during the transient.

The culture was continued after the CO_2 step-increase and a new steady-state was reached with CO_2 enrichment allowing the characterization of the yeast long-term response to the shift-up (Steady-state ASS2 detailed in Tableau 37).

In order to investigate the dependence of the yeast short-term response to the amplitude of CO_2 stress another steady-state culture C-SS1 was submitted to a step-increase of 9.89 % of the CO_2 molar fraction in the inlet gas under 0.1 bars overpressure (equivalent to + 2.96 mM $\text{CO}_{2,1}$). In response to this CO_2 step increase the $\text{CO}_{2,1}$ concentration quickly increased from 1.4 mM to 4.0 mM and the dissolved O_2 concentration decreased from 0.16 to 0.09 mM (Figure 34). The pH was in between 4.99 and 5.01 during the transient (data not shown).

Similarly to what was observed in the 5.29 mM dissolved CO_2 step-increase small amounts of acetate were excreted in the broth and the specific ethanol consumption rate transiently decreased. The respiration rates increased instantaneously after the step-increase, peaked at $0.116 \text{ mole} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (+ 37 %) for $r\text{O}_2$ 22 min after the shift-up and $0.117 \text{ mole} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ (+ 30%) for CO_2 31 min after the shift –up. An oscillatory behavior of the respiration rates was observed during the transient with a period of 90 min. These evolutions were reflected by similar evolutions of the specific respiration rates $q\text{O}_2$ and $q\text{CO}_2$.

The intracellular trehalose concentration decreased rapidly from the steady-state value of $0.56 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1}$ to $0.22 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1}$ at 10 min. The intracellular trehalose recovered its steady-state value at 134 min. following an oscillatory pattern. On the other hand the intracellular glycogen content stayed close to the steady-state value of $1.12 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1}$ during the first 10 min of the pulse, decreased to $0.91 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1}$ at 20 min and recovered its steady-state value at 134 min following an oscillatory pattern. The specific trehalose rate $q_{\text{trehalose}}$ quickly changed from the steady-state positive value ($0.05 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) to a negative value ($-2.18 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ at 5 min) whereas the specific glycogen rate

decreased from the steady-state positive value ($0.10 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) to a negative value only after 11 min ($-1.34 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ at 19 min) indicating that trehalose mobilization was faster than for glycogen.

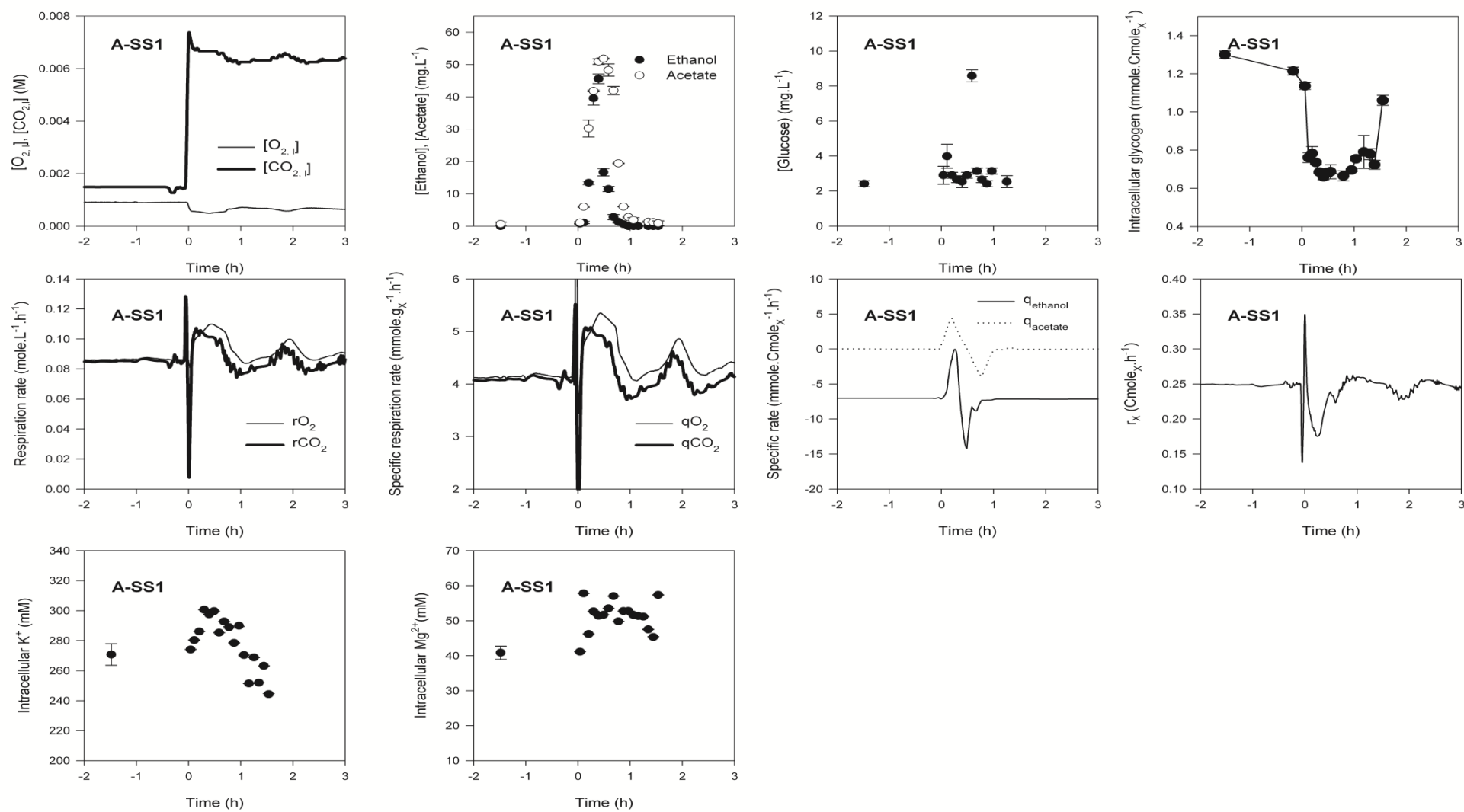


Figure 33. Overview of the yeast transient response to the 5.29 mM CO₂ shift-up. The shift-up was performed at t = 0h.

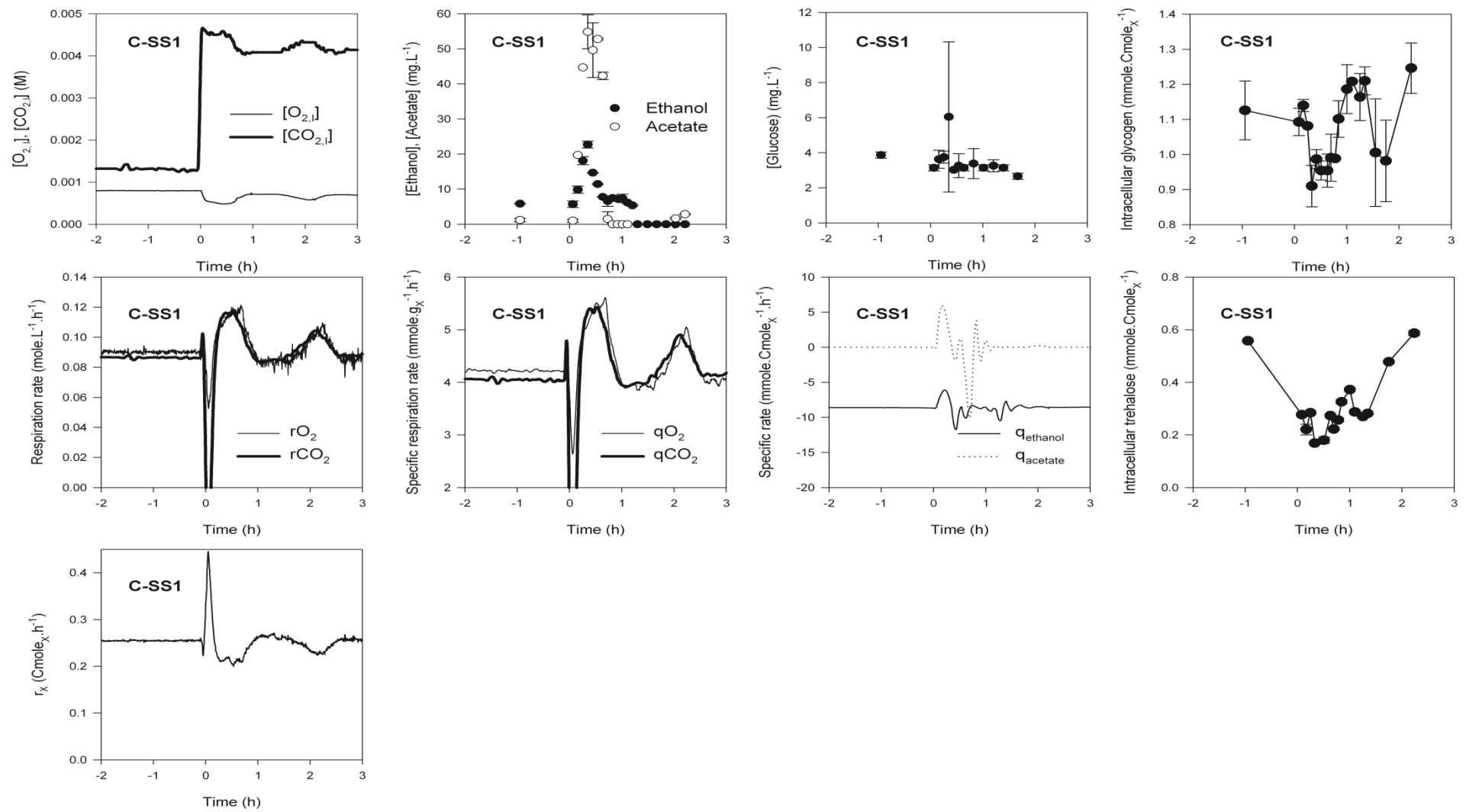


Figure 34. Overview of the yeast transient response to the 2.96 mM CO₂ shift-up. The shift-ups was performed at t = 0h.

4.2.4.3 Short-term responses to repeated step-increases of CO_{2,1} concentration

The CO₂-enriched steady-state culture A-SS2 was submitted to two successive step-increases in the CO₂ molar fraction in the inlet gas. The amplitude of the CO₂ stress was similar to the first shift-up as the CO₂ mole fraction was elevated from 14.92 % to 29.98 % under 0.3 bars overpressure. 80 min after this step-increase a new increase of the CO₂ molar fraction in the inlet gas was performed (from 29.98% to 44.86% under 0.3 bars overpressure). The purpose of the work was to compare the yeast transient response to these CO₂ step-increases (from 14.92% to 29.98% and then to 44.86%) and the response obtained during the first CO₂ step increase (from 0.03% to 14.92%). The obtained response is presented in the Figure 35.

The CO_{2,1} concentration increased from 6.75 mM to 12.50 mM in response to the first shift-up and from 12.50 mM to 17.84 mM in response to the second step-increase. Inversely the dissolved O₂ concentration decreased from 0.16 mM to 0.11 mM and from 0.1 mM to 0.05 mM during the first and second step-increases respectively. The pH value did not change during the transient as the value stayed in between 4.99 and 5.01 (data not shown).

Acetate concentration increased from low residual concentrations (<1 mg.L⁻¹) to 11 mg.L⁻¹ 30 min after the first shift-up before decreasing to the steady state value at 67 min. Following the second shift-up acetate concentration sharply increased up to 67 mg.L⁻¹ at 431 min. The corresponding acetate specific rate increased from the first shift-up and reached 2.05 mmole.Cmole_X⁻¹.h⁻¹ at 16 min before going negative from 30 min to 71 min which points out a transient acetate production followed by its consumption. The acetate specific rate increased again after the second step-increase up to 3.75 mmole.Cmole_X⁻¹.h⁻¹ at 108 min. Ethanol concentration rose linearly from low residual concentrations (<2.6 mg.L⁻¹) to 15 mg.L⁻¹ at 73 min and 187 mg.L⁻¹ at 431 min. The corresponding ethanol specific rate remained negative indicating ethanol was not produced during the transient although the consumption rate slightly decreased. The glucose residual concentration remained low (< 2 mg.L⁻¹) during the observation period.

During the transient following the first step-increase the O₂ and CO₂ consumption rate remained close to their steady-state value. These evolutions were reflected by comparable evolutions of the specific respiration rates qO₂ and qCO₂. Following the second CO₂ shift-up the O₂ consumption rate decreased from 0.092 mole.L⁻¹.h⁻¹ to 0.087 mole.L⁻¹.h⁻¹ at 87 min and then linearly increased to reach 0.090 mole.L⁻¹.h⁻¹ after 3h. On the other hand the CO₂ production rate sharply decreased to 0.080 mole.L⁻¹.h⁻¹ at 87 min, then increased and reached 0.087 mole.L⁻¹.h⁻¹ at 3h.

The intracellular glycogen concentration decreased rapidly from the steady-state value of 0.61 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ to 0.51mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ at 19 min. The intracellular glycogen content

remained at this lower value during most of the transient but recovered the steady-state value at 120 min. The corresponding glycogen specific rate changed from production ($q_{\text{glycogen}} = 0.05 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$) during the steady state to consumption during the first 14 min of the transient (q_{glycogen} down to $-0.33 \text{ mmole}_{\text{glucose}} \cdot \text{Cmole}_X^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 8 min after the shift-up) before going back to positive values during the rest of the transient. Intracellular trehalose content was not measured during the transient.

The measured magnesium concentration in the broth decreased after the shift-up and therefore the calculated intracellular magnesium concentrations were between 34 and 47 mM during the transient. The measured potassium concentration in the broth linearly increased from the shift-up which was mirrored by a continuous decrease of the calculated intracellular potassium concentration from 280 mM to 238 mM after 73 min and 211 mM after 148 min.

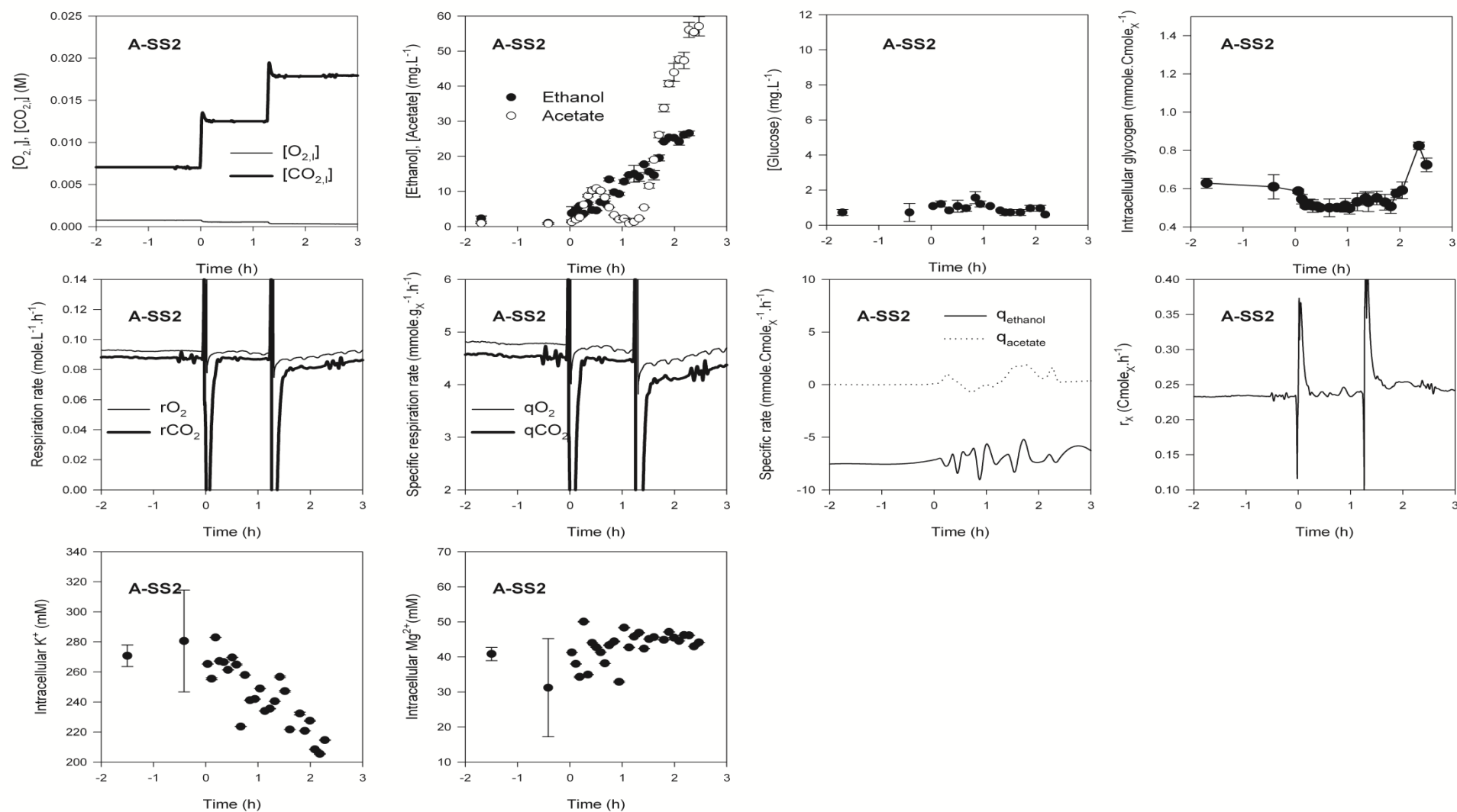


Figure 35. Overview of the yeast transient response to the 5.34 and 5.27 mM successive CO_2 shift-up. The shift-ups were performed at $t = 0\text{h}$ and $t = 1.28\text{h}$ respectively.

4.2.5 Discussion

4.2.5.1 Long-term response to a CO₂ shift-up

The steady-state culture carried out in the presence of CO₂ enrichment (A-SS2, B-SS1) showed substantial difference with the corresponding steady-state cultures carried out in the absence of CO₂ enrichment (A-SS1, B-SS2).

A decrease in the biomass yield of 6.6 % and 13.5 % was observed when the CO_{2,1} concentration was increased from 1.489 mM to 6.759 mM and from 1.426 mM to 17.198 mM respectively. This reduction confirmed results reported previously for fed-batch (Chen et al., 1976) and chemostat (Aguilera et al., 2005b) cultures where the maximal reduction was 54% for a CO_{2,1} concentration increase from 1.478 mM to 25.453 mM and 24% for a CO_{2,1} concentration increase from 0.22 mM to 22.30 mM respectively.

An increase in the oxygen specific consumption rate of 18.0 % and 25.6 % was observed when the CO_{2,1} concentration was increased from 1.489 mM to 6.759 mM and 17.091 mM respectively. Higher specific respiration rates (+74 %) were also observed in the presence of CO₂ enrichment (CO_{2,1} concentration of 22.30 mM) during a chemostat culture by (Aguilera et al., 2005b).

Metabolic flux calculations were performed using the values obtained in the present work and previously reported data from (Aguilera et al., 2005b) that were obtained in comparable conditions for comparison. The ATP to biomass yield (Y_{ATP}) was linearly reduced when the dissolved CO₂ concentration increased as shown in Figure 36. Therefore high concentrations of dissolved CO₂ created an energy drain that proportionally increased with the CO₂ concentration. These results showed that the presence of CO₂ enrichment inhibited biomass growth, enhanced the yeast catabolism and hence affected the yeast energetic homeostasis.

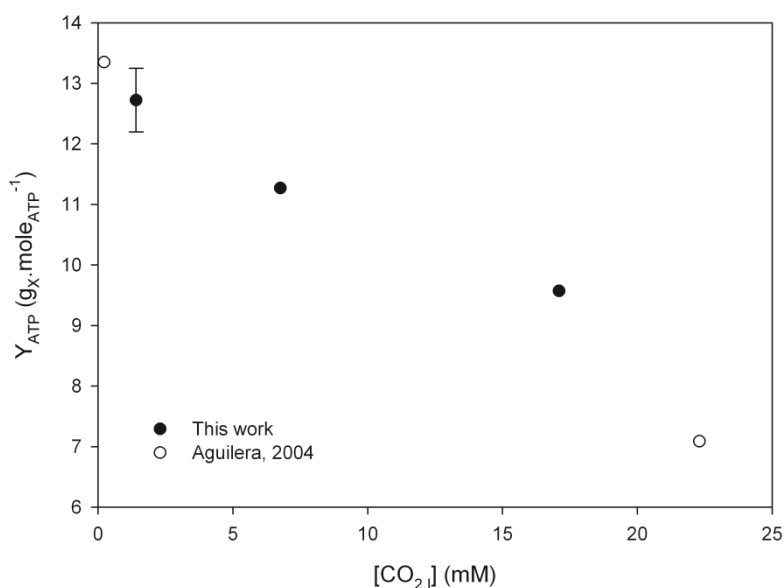


Figure 36. Calculated values of Y_{ATP} against the corresponding dissolved CO_2 concentrations. Y_{ATP} values were calculated using the metabolic model with reconciled values obtained in this work and from (Aguilera et al., 2005b). The error bar represents the standard deviation of the Y_{ATP} values obtained for the three steady-states that were not enriched with CO_2 (A-SS1, B-SS2 and B-SS1).

Succinic acid production was observed in CO_2 enriched steady-state cultures and succinate represented 0.70 % and 2.84 % of the overall C-mole balance for dissolved CO_2 concentrations of 6.759 and 17.198 mM respectively (Tableau 37). Succinic acid production was also increased in carbon-limited and nitrogen-limited chemostat culture exposed to high $CO_{2,l}$ concentration although this result was not discussed by the authors (Aguilera et al., 2005b). In batch cultures succinate production was not detected for the strain *S. cerevisiae* CEN.PK 113 -5 D exposed to $CO_{2,l}$ concentrations up to 23 mM (Otero Romero, 2009) although an increase of the succinate molar yield on glucose with the $CO_{2,l}$ concentration was observed for batch cultures of the mutant strain *S. cerevisiae* RWB525 deleted for the pyruvate decarboxylase (Zelle et al., 2010). Comparison of our results with those from (Aguilera et al., 2005b) confirmed that in carbon-limited chemostat cultures the succinic acid production rate increased with elevated $CO_{2,l}$ concentrations (Figure 37).

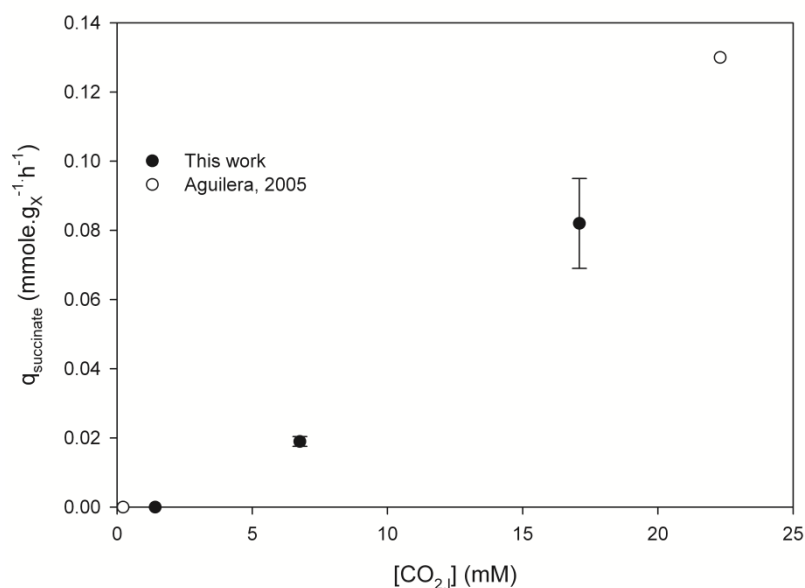


Figure 37. Succinic acid specific production rate against the corresponding dissolved CO₂ concentrations. The error bar represents the standard deviation of the $q_{\text{succinate}}$ values obtained for the different steady-states. The values were obtained from this work and from (Aguilera et al., 2005b).

A similar linear relationship between succinate production and dissolved CO₂ concentrations has been reported in batch cultures (Zelle et al., 2010). An inhibition of the enzyme succinate dehydrogenase may explain succinate excretion. A competitive inhibition of the succinate dehydrogenase by bicarbonate ions has indeed been reported for eukaryotic cells such as soybean (Gonzalez-Meler et al., 1996) from a bicarbonate concentration of 0.17 mM, rat liver mitochondria from 20 mM (Swierczynski and Davis, 1978) or 16.6 mM (Wanders et al., 1983) and pig heart cells (Zeylemaker et al., 1970) where the inhibition constant was estimated to be around 12 mM. Assuming the mitochondrial matrix pH was 7.3 (Orij et al., 2009) the mitochondrial bicarbonate concentrations were calculated to be 35.952 ± 2.248 mM in non-enriched cultures and 172.543 ± 0.459 mM and 436.273 ± 0.626 mM for A-SS2 and B-SS1 respectively which support a specific inhibition of the enzyme succinate dehydrogenase activity by high bicarbonate concentrations in the mitochondrial matrix as also suggested by (Zelle et al., 2010) and (Marc et al., 2013) for *S. cerevisiae*.

Steady state chemostat cultures revealed that high CO₂ concentrations resulted in an energetic drain and in modifications of the yeast metabolism including higher respiration rate and succinate production. The slight increase of the intracellular magnesium concentration under CO₂-enriched conditions may be related to the increase of ATP generation and dissipation. This energy may be required for cellular homeostasis to face the CO₂ stress. A transient study may be more adapted to reveal the mechanisms underlying the yeast response to CO₂.

4.2.5.2 Short-term responses to step-increases of CO_{2,i} concentration

Yeast steady-state chemostat cultures (A-SS1 and C-SS1) were submitted to step-increases of different intensities of the CO₂ molar fraction in the inlet gas: 14.92% under a relative pressure of 0.3 bars (+5.29 mM dissolved CO₂) and 9.89 % under a relative pressure of 0.1 bars (+2.96 mM dissolved CO₂) respectively. The yeast transient response to these perturbations was monitored i) to investigate the yeast short-term response to a CO₂ step increase ii) to elucidate if this response could be related to the amplitude of the CO₂ step-increase. In both case the CO₂ step-increase triggered a metabolic response characterized by an increase in the specific respiration rates that displayed a transient oscillatory behavior, in the excretion of acetate, and a decrease in ethanol consumption and a mobilization of glycogen and trehalose. It was also shown that the intracellular concentrations of K⁺ and Mg²⁺ increased upon the 5.29 mM CO₂ shift-up.

The observed increase in the respiration rates r_{O_2} and r_{CO_2} after a CO₂ shift-up suggested either that the glycolytic flux temporary increased or that the biomass synthesis rate transiently decreased. As the chemostat inlet and outlet flows were not changed during the step-increase experiments and glucose residual concentration remained low during the transients, an increase in the glycolytic flux could originate only from the degradation of the intracellular polysaccharide pool. The extra carbon during the first oscillation of the transient following the 5.29 mM step-increase (from 0 to 54 min) was calculated from the r_{CO_2} and the $r_{acetate}$ to be 18.47 mCmole. It did not match with the carbon released from the measured mobilization of glycogen (5.80 mCmole) and potentially released from the total mobilization of the trehalose pool (3.05 mCmole). The same holds true for the first oscillation following the 2.96 mM step-increase (from 0 to 61 min): the extra carbon observed during the first oscillation was 25.56 mCmole whereas the carbon released from glycogen and trehalose mobilization was 1.173 mCmole total. The carbon released from the storage polysaccharide during the duration of the first oscillation was lower in the 2.96 mM step-increase because the glycogen pool replenishment was faster after the initial consumption than in the 5.29 mM shift-up. In both case the degradation of storage polysaccharides could not quantitatively explain the extra carbon (CO₂ and acetate) observed during the transients. Therefore the active biomass formation rate temporarily decreased following the CO₂ step-increases as shown from the mass balances calculations. The decrease in the biomass synthesis rate may explain the RQ values during the transients which were slightly lower than the corresponding steady-state values as also reported by (Krook et al., 2004).

The short-term response of a yeast chemostat culture to a small step-increase of the CO₂ concentration (from 0.036 % to 1.0 % under a relative pressure of 0.3 bars, corresponding to +

0.35 mM dissolved CO₂) has been documented (Aboka et al., 2012; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a). The authors reported a temporary increase in the specific respiration rates from 0.042 moleO₂.Cmole_X⁻¹.h⁻¹ to 0.070 moleO₂.Cmole_X⁻¹.h⁻¹ that could be quantitatively explained by a strong mobilization of both the glycogen and trehalose pools (2.5 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ glycogen and 7.5 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ trehalose) and not by a decrease in the biomass synthesis rate. The glycogen mobilization during the two CO₂ step-increases related in the present work were smaller (0.21 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ and 0.49 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹) even though the CO₂ step-increases were much higher (2.96 mM and 5.29 mM). Hence, the mobilization of the storage sugars cannot be quantitatively related to the amplitude of the CO₂ shift-up. The total storage compounds pool was around 20 mmole_{glucose}.Cmole_X⁻¹ in (Aboka et al., 2012; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a) which is much higher than the pool measured in our work (< 2 mmole_{glucose}.g_{DW}⁻¹). This difference is due to the higher dilution rate used in this study (around 0.15 h⁻¹ against 0.05 h⁻¹) (Sillje et al., 1999). Consequently it seems that the more storage sugars available, the higher the trehalose and glycogen mobilization, no matters the amplitude of the CO₂ stress. Therefore this work confirms that CO₂ triggers the mobilization of the storage sugars pool as suggested by (Aboka et al., 2012) but showed that the degree of the mobilization is dose-dependent to the storage sugar levels.

Furthermore, the 2.96 mM transient confirmed the fast mobilization of the trehalose pool and delayed degradation of the glycogen pool in response to a CO₂ stress as reported by (Aboka et al., 2012; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a). Interestingly, the glycogen pool mobilization was not delayed in the 5.29 mM transient, suggesting that the onset of glycogen mobilization may be related to the CO₂ level.

The observed transient acetate formation and decrease in ethanol consumption may be due to a rearrangement of the intracellular fluxes following the CO₂ stress as already suggested upon a benzoic stress (Kresnowati et al., 2008c).

The transient increase in the respiration rates after the CO₂ step-increase indicates a rise in the energy generation and generation by the yeast metabolism. In the present work the increase in catabolism observed during the transients could not be explained only by the mobilization of the storage sugars but was related to a decrease in the biomass production rate. Therefore, the observed respiration burst may reflect the energy requirement of the cells to face the CO₂ step-increase and not an uncontrolled storage sugars mobilization triggered by the CO₂ shift-up. CO₂ impact on microorganisms is widely attributed to its impact on the intracellular pH (Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Mashego, 2005a; Orij et al., 2011; Orij et al., 2012) even though very few studies have measured this impact or challenged it on a quantitative basis (Kresnowati et al., 2008a).

The ATPase Pma1p located in the plasma membrane expels one proton at the cost of one ATP (Perlin et al., 1986; Serrano, 1984). This proton pump is one of the main mechanisms involved in the intracellular pH homeostasis (Orij et al., 2011) especially when the yeast cells are submitted to a weak acid stress (Holyoak et al., 1996; Ullah et al., 2012; Verduyn et al., 1992). In the present work protons originating from the intracellular dissociation of CO_2 into H^+ and bicarbonate may be expelled by the Pma1p whereas bicarbonate ions do not diffuse through the membrane and no transporter has been discovered to date (Zhao and Reithmeier, 2001). Therefore the action of the proton pump would lead to an intracellular accumulation of bicarbonates ions that may change the electrical potential of the plasma membrane (López et al., 1999). The increase in the intracellular concentrations of potassium observed during the 5.29 mM corresponds to the maximum respiration rate and may be required to restore the internal charge balance and then the plasma membrane potential. Potassium incorporation as a response to CO_2 stress has been reported by several authors (López et al., 1999; Ryan et al., 1971; Ryan et al., 1972) although the potassium accumulation could not be related to the CO_2 intracellular concentration (López et al., 1999). In the present work the 5.29 mM CO_2 step-increase would yield a 28 mM increase in the intracellular bicarbonate concentration (assuming a constant intracellular pH), which corresponds to the increase of the intracellular potassium concentration. Interestingly, the intracellular CO_2 concentration peaked at 4 min whereas the maximum intracellular potassium concentration was reached at 18 min. This delay might correspond to the time required to induce the synthesis of the potassium membrane carriers Trk1p and Trk2p (Ko and Gaber, 1991). The intracellular potassium decreased after 30 min and was eventually similar in the CO_2 -enriched steady-state A-SS2 to the previous steady-state A-SS1. On the other hand, the instantaneous increase in the intracellular magnesium concentration may be linked to the increased respiratory rates as this ion is used as a co-factor by many enzymes.

4.2.5.3 Acquisition of resistance to high CO_2 concentration

The steady-state chemostat A-SS1 (1.49 mM $\text{CO}_{2,i}$) was exposed to a step-increase of the dissolved CO_2 concentration (5.29 mM $\text{CO}_{2,i}$) and displayed a transient followed by a long term response which was characterized by an energy drain. This long-term response raises the question of whether or not the cells adapt to high dissolved CO_2 concentration on the long-run as already shown for benzoic acid stress (Kresnowati et al., 2008c). Particularly, the bicarbonate ions originating from the CO_2 intracellular dissociation might accumulate into the cells due to the absence of an active carrier like Pdr12p for the uncharged form of weak organic acids. This

accumulation might lead to further uptake to potassium ions to balance the electric potential of the plasma membrane and eventually create an osmotic stress (López et al., 1999). However, this scenario was not observed as the intracellular potassium concentration decreased after 30 min in the 5.29 mM transient and was eventually similar in the CO₂-enriched steady-state A-SS2 to the previous steady-state SS1. This result would suggest that cells have adapted to reduce the CO₂ turnover that drives the K⁺ accumulation.

This hypothesis was challenged by submitting a CO₂ enriched steady-state (A-SS2; 6.76 mM dissolved CO₂) culture to a new step-increase of the CO_{2,l} concentration of the same intensity (from 6.76 to 12.55 mM CO_{2,l}). The results showed that the specific respiration rates did not change after the shift-up, the glycogen mobilization was smaller than during the first step-increase (0.1 mmole_{glucose}·Cmole_X⁻¹ compared to 0.49 mmole_{glucose}·Cmole_X⁻¹), the acetate excretion was lower than observed in the first step-increase (2.0 mmole_{acetate}·Cmole_X⁻¹·h⁻¹ vs 4.2 mmole_{acetate}·Cmole_X⁻¹·h⁻¹) and the increase of ethanol consumption was linear and not hyperbolic. Interestingly, the intracellular potassium concentration decreased during the transient as if the new increase in the intracellular CO₂ concentration led to the exclusion of potassium ions to limit the intracellular osmotic pressure. Consequently, yeast cells grown in presence of CO₂ enrichment showed a different short-term response to a CO₂ step-increase of same intensity than yeast cells grown without CO₂ enrichment. The response to the second CO₂ shift-up was much lower than the response to the first step-increase pointing out that yeast cells may have acquired a resistance to CO₂ stress during the A-SS2. This increase of the resistance to a CO₂ stress may be similar to the increased resistance of yeast cells to H₂O₂ observed during four to five generation after exposure to an initial 0.7M NaCl stress (Guan et al., 2012). However in the present case the long-term effect was observed after stabilization of a new steady-state. Therefore the yeast cells displaying a long-term response to CO₂ in A-SS2 have not experienced the initial CO₂ increase and the stress factors originating from the cells that have actually experienced this stress may be diluted as described by (Guan et al., 2012). Moreover the CO₂ enrichment stress was continued during the A-SS2 after the initial step-increase and not removed as in (Guan et al., 2012). Therefore the yeast cells displaying a long-term response to CO₂ in A-SS2 have experienced a continuous CO₂ enrichment. The mechanisms underlying the lower response to a similar CO₂ step-increase may then not fall under the molecular mechanisms of cellular memory of acquired stress resistance (Guan et al., 2012) but rather under cell adaptation to a stress on the long run as described in (Kresnowati et al., 2008c). In the present work no differences were observed in the mean cellular diameter, the intracellular volume or the intracellular potassium concentration between the CO₂-enriched steady-state A-SS2 and the non CO₂ enriched steady-state A-SS1. The

adaptation to CO₂ may be caused by changes in the plasma membrane composition caused by CO₂ (Castelli et al., 1969) that may lead to a decrease of CO₂ permeability and then to a decrease of the CO₂ turnover as observed for benzoic acid (Kresnowati et al., 2008c). However, the transcriptional expression of genes involved in the synthesis of constituents of the plasma membrane (e.g. *OLE1* and *SPI1*) did not change in yeast cells exposed to high CO₂ concentration (Aguilera et al., 2005b). Therefore, the exact nature of the adaptation to CO₂ is still to be defined.

The repetition of the CO₂ step-increase (from 12.50 mM to 17.84 after 77 min) triggered a more drastic response characterized by a sharp increase in the acetate excretion (up to 3.8 mmole_{acetate}·Cmole_X⁻¹·h⁻¹). Acetate excreted by the cells is a weak acid and may impact the yeast metabolism even at these low concentrations as discussed by (Verduyn, 1992). This weak acid effect would then be simultaneous to the CO₂ effect in these experiments. The ethanol concentration continued to rise linearly meaning that ethanol consumption rate decreased although no shift from oxidative to oxido-reductive metabolism was detected during the observation window. These results suggest that the amplitude of the CO₂ stress required to affect yeast cells that have adapted to high CO₂ concentrations is much higher than for cells that have not been in contact with such high concentrations.

4.2.6 Conclusion

This work reports the comparison of the short-term and/or long-term responses of yeast chemostat cultures to step-increases of the dissolved CO₂ concentration of different intensities.

First of all, we demonstrated that the increase in the dissolved CO₂ concentration triggered a transient response characterized by an increase of the energy generation by the yeast metabolism, a decrease of the biomass synthesis and a rise of the uptake of potassium and magnesium ions. However no clear relation could be established between the amplitude of the CO₂ stress and the yeast short-term response for the two CO₂ step-increases reported in this work. Furthermore, we showed that the energy requirement during the transients could not be quantitatively related exclusively to the energy consumed for pH homeostasis.

Secondly, the long-term response of yeast to CO₂ showed that this compound creates an energy drain that is proportional to its concentration as the Y_{ATP} values decreased with higher CO₂ concentrations. Furthermore, succinate production was observed in CO₂-enriched conditions and could be linked to a specific inhibition of the enzyme succinate dehydrogenase by high mitochondrial concentrations of bicarbonate ions. Finally, yeast cells previously grown under

high dissolved CO_2 concentrations showed a lower response to a step-increase in the dissolved CO_2 concentration suggesting that these cells may have adapted to CO_2 .

This work demonstrated that CO_2 can dramatically impact the yeast homeostasis both on the short and long run. The short-term impact of CO_2 may be relevant for yeast cultures carried out in large bioreactors with imperfect mixing where dissolved CO_2 concentration gradients may occur (Baez et al., 2011). The long-term impact of CO_2 may be of interest in physiological studies as CO_2 is generally considered as a benign product (Hou et al., 2010) but could distort the investigations. The data reported may therefore contribute to a better understanding of the CO_2 impact on yeast.

4.3 Impact of CO_2 on the intracellular pH

L'augmentation transitoire de la respiration cellulaire suite aux échelons CO_2 reflète un besoin en énergie pour faire face au stress cause par l'augmentation de la concentration en CO_2 dissous. Le principal stress CO_2 reporté dans la littérature est un impact sur le pH intracellulaire (Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Mashego, 2005a; Orij et al., 2011; Orij et al., 2012). Dans cette étude l'évolution du pH intracellulaire au cours de l'échelon n'a pas été mesurée. Il est néanmoins possible d'estimer l'action acidifiante du CO_2 par le calcul.

The transient increase in the respiration rates after the CO_2 step-increases indicates a rise in the energy generation by the yeast metabolism. In the present work the increase in catabolism observed during the transients could not be quantitatively explained by the mobilization of the storage sugars but was related to a decrease in the biomass production rate (see section 4.2.5.2). Therefore, the observed respiration burst may reflect the energy requirement of the cells to face the CO_2 step-increase and not an uncontrolled storage sugars mobilization triggered by the CO_2 shift-up. CO_2 impact on micro-organisms is widely attributed to its impact on the intracellular pH (Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Mashego, 2005a; Orij et al., 2011; Orij et al., 2012) even though very few studies have challenged this impact on a quantitative basis (Kresnowati et al., 2008a). The intracellular CO_2 concentration increased during the transients due to the increase in i) the CO_2 concentration in the broth ii) the respiration rate. The intracellular carbon dioxide concentration could not be recalculated from the CO_2 flux as suggested by (Kresnowati et al., 2008a) and explained in section 1.3.4) as the respiration rates were noisy during the first minutes of the transients. The intracellular carbon dioxide concentration was then considered to be at close-equilibrium with the concentration measured in the broth due to the high membrane

permeability parameter for CO₂ is high (0.0035 m.s⁻¹ measured by (Gutknecht et al., 1977)). As the intracellular pH is higher than the pKa of the CO₂ / HCO₃⁻ acid / base pair the intracellular CO₂ dissociates into the cell into H⁺ and bicarbonate ion. The volumetric H⁺ intracellular production flux related to both the CO₂ influx and the increase in the CO₂ production rate was then calculated from the derivative of the intracellular CO₂ concentration and integrated over the transient duration to obtain the increase of intracellular H⁺ concentration.

The maximum calculated increases in the intracellular proton concentration were 3.30 mM and 5.57 mM during the 2.05 mM and 5.29 mM CO₂ step-increases respectively, which correspond to 7.45 and 12.53 $\mu\text{mole}_{\text{proton}}\cdot\text{g}_X^{-1}$. The biomass buffering capacity of yeast cells was measured to be around 400 $\mu\text{mole}_{\text{proton}}\cdot\text{g}_X^{-1}$ (Kresnowati et al., 2008a; Maresová et al., 2010; Sigler et al., 1981). The decrease in the intracellular pH due to the CO₂ step-increases would therefore be 0.018 and 0.032 pH units for the 2.05 mM and 5.29 mM CO₂ step-increases respectively and could theoretically be supported by the cell buffering capacity only.

The ATPase Pma1p located in the plasma membrane expels one proton at the cost of one ATP (Perlin et al., 1986; Serrano, 1984). This proton pump is one of the main mechanisms involved in the intracellular pH homeostasis (Orij et al., 2011) especially when the yeast cells are submitted to a weak acid stress (Holyoak et al., 1996; Ullah et al., 2012; Verduyn et al., 1992). The ATP consumption fluxes due to the increase in CO₂ intracellular concentration during the transients were calculated and compared to the increase in the ATP production flux obtained from the oxygen consumption rate assuming that the efficiency P/O of the respiratory chain was unchanged. The maximum extra-ATP production fluxes were calculated to be $2.64 \cdot 10^{-5}$ and $1.70 \cdot 10^{-5}$ $\text{mole}_{\text{ATP}}\cdot\text{s}^{-1}$ during the 2.05 mM and 5.29 mM CO₂ step-increases respectively whereas the maximum ATP fluxes theoretically consumed by the H⁺-ATPase would be $2.84 \cdot 10^{-6}$ and $3.44 \cdot 10^{-6}$ $\text{mole}_{\text{ATP}}\cdot\text{s}^{-1}$ respectively. Consequently, the increase in ATP production would be 9 and 5 times higher than required by the intracellular pH regulation process. Similarly, the ATP quantity required for pH homeostasis following a benzoic acid pulse in a yeast steady-state culture was calculated to be 32 times lower than the observed increase in ATP production (Kresnowati et al., 2008c). One may note that these simple calculations do not consider the impact of the CO₂ turnover between the cell and the broth on the H⁺ intracellular flux. The extend of this turnover is unknown but could explain the difference between the calculated ATP consumption and production fluxes and caused an intracellular pH decrease more drastic than previously calculated.

4.4 Oscillatory behavior of the yeast transient response to CO₂

A gradually attenuated oscillatory behavior of the respiration rates was observed in both CO₂ step-increases. The periods of these oscillations were 90 min and 70 min in the 2.96 mM and 5.29 mM transients suggesting that these oscillations were metabolic oscillations and not glycolytic oscillations (Patnaik, 2003). Furthermore, degradation and replenishment of the storage sugars compounds in phase with ethanol and acetate production were observed during these oscillations, pointing out that they were dependent of the cells cycle synchronization contrary to the short-period metabolic oscillations reported by (Keulers, 1996; Keulers et al., 1996; Satroutdinov et al., 1992). CO₂ has been considered as a likely candidate for synchronization of the short-period metabolic oscillations (Keulers et al., 1996) but its role in cell-cycle related oscillations has not been underlined so far. A decrease in the intracellular pH due to the increase of the CO₂ intracellular concentration may lead to a rise of the cAMP intracellular concentration that would trigger the storage sugar mobilization and then the onset of dampened oscillations (Aboka et al., 2012; Keulers et al., 1996). However, we demonstrated that the influence of CO₂ on the intracellular pH might be low (section 4.3) and then the oscillations would not likely be caused by an intracellular acidification. Further investigations on the link between the CO₂ concentration and the triggering of metabolic oscillations are necessary.

4.5 Kinetic effect of CO₂ enrichment

The linear relationship between the CO₂ concentration and the succinic acid production observed in the different steady-state chemostat in our work (Tableau 37, Figure 37) and in (Zelle et al., 2010) suggested that the enhancement of succinate production may be related to kinetics effects as dissolved CO₂ or bicarbonate are involved in many metabolic pathways. Relevant pathways include the reactions involved in the pyruvate branching points catalyzed by the Pyruvate Decarboxylase, Pyruvate Carboxylase and Pyruvate Dehydrogenase complex; the TCA reactions catalyzed by the isocitrate dehydrogenase and the oxo-glutarate dehydrogenase complex and the reactions involved in the glyoxylate shunt. Thermodynamic data about *in-vivo* like equilibrium constants could be found for Pyruvate Carboxylase and Isocitrate Dehydrogenase only (Goldberg et al., 2004; Otero Romero, 2009). Using the thermodynamic approach developed in (Otero Romero, 2009) we calculated that the dissolved CO₂ concentration shift-ups carried out in this work would result in a decrease of 3644 J.mole⁻¹ and 6271 J.mole⁻¹ of the Gibbs free energy of the pyruvate carboxylation reaction for a step-increase from 1.489 mM to 6.759 mM and for a step-increase from 1.426 to 17.091 mM respectively. This thermodynamic

effect would lead to a more favorable pyruvate carboxylation reaction and then to an increased anaplerotic carbon replenishment flux of the TCA. Furthermore, the K_m value of the enzyme Pyruvate Carboxylase for bicarbonate ions was reported to be 1.36 mM for wild type *S. cerevisiae* (Branson et al., 2004). The intracellular bicarbonate ions concentrations in the different steady-state chemostat cultures were calculated assuming that the intracellular $\text{CO}_{2,i}$ concentration was at equilibrium with the broth concentration and that the intracellular pH value was 6.6 (Kresnowati et al., 2007). These values were found to be 7.160 ± 0.447 mM in non-enriched cultures and 34.367 ± 0.091 mM and 86.897 ± 0.124 mM for A_SS2 and B_SS1 respectively. Therefore, the increase in the intracellular concentration of bicarbonates ions in CO_2 -enriched cultures is not likely to yield an increase of the flux of the reaction catalyzed by the enzyme Pyruvate Carboxylase through mass action effect.

4.6 Récapitulatif des résultats

- La réponse à court-terme de la levure au CO₂ a été étudiée pour deux incréments de la concentration en CO₂ dissous (2.96 et 5.29 mM). Le comportement dynamique de la levure sur cette fenêtre d'observation est caractérisé par :
 - une augmentation rapide des vitesses spécifiques de respiration (q_{O_2} et q_{CO_2}) de + 24-27% pour l'échelon à 5.29 mM et + 30-37 % pour l'échelon à 2.96 mM.
 - une mobilisation puis reformation du contenu en tréhalose et glycogène. Cette mobilisation des substances de réserve intracellulaires est à mettre en relation avec une production transitoire d'acétate ($q_{acétate}$ de 4 mmole.g_x⁻¹.h⁻¹) et une diminution transitoire de la vitesse de consommation d'éthanol.
 - une diminution transitoire de la vitesse de production de biomasse.
 - pour l'échelon à 5.29 mM il a été observé un accroissement transitoire de la concentration en ions potassium (+30 mM) et magnésium (+10-20 mM).
 - un comportement oscillant des vitesses spécifiques de respiration, de la mobilisation puis reformation des sucres de réserve, de l'excrétion d'acétate et d'éthanol mis en évidence sur la fenêtre d'observation avec une période de 90 min et 70 min pour les échelons à 2.96 et 5.29mM respectivement.
- Ces incréments de faibles amplitudes (2.96 et 5.29 mM) de la concentration en CO₂ dissous ont donc un impact fort sur la levure *S. cerevisiae*. La réponse à court-terme de la levure est donc caractérisée par une augmentation de la production et consommation d'énergie afin maintenir l'homéostasie du pH intracellulaire et vraisemblablement de la pression de turgescence en réponse au stress acide provoqué par un accroissement brusque de la concentration en CO₂ dissous.
- L'étude de la littérature a montré que l'action du CO₂ sur la levure serait principalement liée à son impact sur le pH intracellulaire. Néanmoins le calcul montre que l'augmentation de la vitesse de production d'ATP lors du régime transitoire serait de 5 à 9 fois supérieure à la demande énergétique nécessaire au maintien du pH intracellulaire. Le lien entre la réponse observée et de l'homéostasie du pH intracellulaire reste donc à explorer.
- La réponse à long-terme de la levure au CO₂ dissous a été étudiée pour trois concentrations d'enrichissement en CO₂ dissous (1.6, 6.75 et 17.19 mM). Cette réponse est caractérisée par :
 - une diminution du rendement en biomasse par rapport aux substrats carbonés consommés et une augmentation des vitesses spécifiques de respiration. Le

paramètre Y_{ATP} diminue donc avec l'augmentation de la concentration en CO_2 dissous. Ceci traduit une majoration de la dissipation d'énergie lors d'un enrichissement en CO_2 probablement lié à l'exigence énergétique pour les processus de maintien de l'homéostasie cellulaire.

- Une corrélation spécifique entre la vitesse spécifique de production de succinate et la concentration en CO_2 dissous a été mise à jour. Ce phénomène est probablement lié à une inhibition du complexe succinate déshydrogénase par une concentration mitochondriale élevée des ions hydrogénocarbonates.
- La réalisation d'un échelon d'augmentation de la concentration en CO_2 dissous sur des cellules cultivées en régime permanent en présence d'un enrichissement en CO_2 montre que la réponse dynamique obtenue est de plus faible amplitude que celle obtenue pour un échelon réalisé sur des cellules cultivées en régime permanent sans présence d'un enrichissement en CO_2 . Ce phénomène fait suspecter l'acquisition cellulaire d'une résistance au CO_2 .
- Ces travaux proposent pour la première fois une description croisée de l'impact à court-terme et à long-terme du CO_2 sur la physiologie de *S. cerevisiae*. Ils complètent donc les travaux réalisés auparavant sur l'effet à court-terme (Aboka et al., 2012; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a) et à long-terme (Aguilera et al., 2005b) du CO_2 . Ils proposent en particulier une mesure directe de la concentration en CO_2 dissous dans le moût. L'utilisation de capteurs à CO_2 dissous pour des cultures continues est cependant limitée par les problèmes de dérive rencontrés lors de cultures prolongées comme rapportée par d'autres auteurs (Kresnowati et al., 2008b).
- L'impact du CO_2 dissous sur les performances de culture est généralement considéré comme mineur pour la gamme de concentration étudiée dans ce travail (voir chapitre 1.3). Cette étude démontre pourtant que des concentrations modestes en CO_2 dissous de l'ordre de celles pouvant être atteintes dans des réacteurs industriels ont un impact non négligeable à court-terme et à long-terme sur la levure *S. cerevisiae*.

5. Etude de l'impact du dioxyde de carbone sur la transition respiro-fermentaire
chez *S. cerevisiae*

5.1 Introduction

Ce chapitre est rédigé sous forme d'un article scientifique qui sera soumis pour publication dans un journal scientifique à comité de lecture.

La maîtrise de la transition du métabolisme oxydatif au métabolisme oxydo-fermentaire est un enjeu important pour l'industrie utilisant la levure *S. cerevisiae* en mode oxydatif. L'origine de cette transition métabolique a fait l'objet de nombreux travaux dans la littérature mais est toujours mal comprise. Les travaux récents s'intéressent à l'action de modulateurs globaux agissant au niveau moléculaire. Le dioxyde de carbone est un composé majeur du métabolisme microbien mais paradoxalement son rôle dans le déclenchement de la transition respiro-fermentaire chez *S. cerevisiae* n'a pas été investigué.

L'étude présentée dans ce chapitre s'intéresse donc au rôle du CO₂ dans le déclenchement de l'effet Crabtree chez *S. cerevisiae*. La démarche adoptée consiste à étudier la transition respiro-fermentaire en présence et absence d'un enrichissement en CO₂. Les expérimentations ont été réalisées en utilisant la technique de l'accélérostat qui permet d'approximer une large gamme de régimes permanents par un balayage lent des taux de dilution correspondants (Paalme and Vilu, 1992). Deux accélérostats ont été réalisés en l'absence et en présence d'un enrichissement en CO₂ dans le mélange gazeux de ventilation permettant d'augmenter artificiellement la concentration en CO₂ dissous. L'amplitude de l'enrichissement en CO₂ est choisie de façon à atteindre environ 2 fois la concentration en CO₂ dissous mesurable en culture fed batch à pression atmosphérique. Les résultats obtenus sont analysés et discutés par rapport à la littérature.

5.2 Publication

Does CO₂ impact the onset of the Crabtree effect in Saccharomyces cerevisiae?

Lannig Richard¹²³, Stéphane E. Guillouet¹²³⁴, Jean-Louis Uribelarrea¹²³.

¹ Université de Toulouse, INSA, UPS, INP, LISBP, 135 Av. de Rangueil, F-31077 Toulouse, France.

² INRA, UMR792, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, F-31400 Toulouse, France.

³ CNRS, UMR5504, Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés, Toulouse F-31400, France.

⁴ Corresponding author at Laboratoire d'Ingénierie des Systèmes Biologiques et des Procédés – INSA, UMR INSA/CNRS 5504 - UMR INSA/INRA 792, 135 Avenue de Rangueil, 31077 Toulouse Cedex 4, France. Email address : stephane.guillouet@insa-toulouse.fr. Phone : +335 61 55 94 47.

Authors' contribution

SG and JLU defined the research theme.

LR, SG and JLU designed the experiments.

LR carried out the fermentation experiments, the laboratory work and analysed the data.

LR, SG and JLU wrote the paper.

All authors have read and approved the manuscript.

5.2.1 Abstract

The onset of the Crabtree effect in *S. cerevisiae* has been related with a limited capacity of the yeast respiratory capacity. Carbon dioxide is involved in many reactions that belong to the respiratory capacity but its role on the shift from oxidative to oxido-reductive has never been considered so far.

The aim of this study was to investigate the impact of CO₂ on the onset the Crabtree effect using the accelerostat technique to characterize the metabolic shift without CO₂ enrichment and under high dissolved CO₂ concentrations obtained by CO₂ enrichment (44.89% CO₂ in the inlet gas equivalent to 15.7 mM dissolved CO₂).

Without CO₂ enrichment the specific growth rate increased linearly with the dilution rate and the critical specific growth rate was identified to be 0.256 h⁻¹. With CO₂ enrichment the specific growth rate decreased with the increasing dilution rate on the start of the acceleration. Therefore yeast cells exposed to high dissolved CO₂ concentration could not keep up with the increasing dilution rate whereas non CO₂ stressed yeast could. The energy sink created by high dissolved CO₂ concentration may alter the cellular ability to adapt to a changing environment. The impact of high CO₂ concentration on the onset of the Crabtree effect was discussed.

Keywords: yeast, *S. cerevisiae*, carbon dioxide, adaptability, Crabtree effect

5.2.2 Introduction

The baker's yeast *S. cerevisiae* is commonly used for biomass-directed applications such as the production of baker's yeast, of yeast extract or heterologous protein but can also be used to produce ethanol fuel, wine or bread. These applications required the yeast metabolism to be purely oxidative and oxido-reductive or fermentative respectively. A purely respiratory metabolism is possible only in aerobic glucose limited continuous culture at a dilution rate below the so-called critical dilution rate (D_c) and is characterized by a high biomass to glucose yield (around 0.5 g_X·g_{glucose}⁻¹) and the absence of by-products such as ethanol, glycerol or weak organic acids (Van Maris et al., 2001). The transition from purely oxidative to oxido-reductive metabolism is marked by a decrease in the biomass yield and by by-products formation. The aerobic production of ethanol is named the Crabtree effect and is characterized by simultaneous respiration and fermentation. This metabolic shift occurs in the long-term in aerobic glucose-limited chemostat or fed-batch culture when the specific growth rate rose above the critical

dilution rate (D_c) value or in the short-term in presence of a glucose concentration higher than 1 mM (Petrik et al., 1983; Verduyn et al., 1984).

The onset of alcoholic fermentation in aerobic culture *S. cerevisiae* has been thoroughly investigated and attributed to a limitation of the respiratory capacity (Alexander and Jeffries, 1990; Sonnleitner and Käppli, 1986). The respiratory capacity includes all the cytosolic and mitochondrial reactions that may be involved in the respiratory catabolism of pyruvate (Flikweert et al., 1999; Postma et al., 1989; Pronk et al., 1996). Over the years many studies have unsuccessfully focused on the identification of the rate-limiting reaction through genetic deletion or overexpression of enzymes catalyzing reactions involved in the respiratory capacity (Bauer et al., 1999; Flikweert et al., 1997; van Hoek et al., 1998; De Jong-Gubbels et al., 1998; Pronk et al., 1994). A more successful approach was the modification of global regulators that might influence the expression of genes involved in the respiratory capacity (Van Maris et al., 2001). The deletion of the genes MIG1 and MIG2 coding for proteins involved in the glucose catabolic repression led to a significant increase of the critical dilution rate from 0.262 h^{-1} to 0.274 h^{-1} rate in accelerostat cultures (Klein et al., 1999). Similarly, overexpression of the HAP4 gene coding for the regulatory peptide Hap4p repressed by the catabolic glucose repression cascade led to an increase of biomass yield in batch cultures (Blom et al., 2000) and to an increase of the critical dilution rate from 0.30 h^{-1} to 0.33 h^{-1} in chemostat cultures (Van Maris et al., 2001). It has also been demonstrated that the use of oleic acid as a co-substrate delayed the on-set of the metabolic shift (Feria-Gervasio et al., 2008) and led to an increase of the critical dilution rate from 0.24 h^{-1} to 0.26 h^{-1} in accelerostat cultures (Marc et al., 2013). The role of the redox balance in the onset of the Crabtree effect in *S. cerevisiae* has recently been underlined (Heux et al., 2006; Hou et al., 2009; Hou et al., 2010; Vemuri et al., 2007). Introduction of NADH, H^+ consuming reactions in the cytosolic (Hou et al., 2009; Vemuri et al., 2007) and mitochondrial (Hou et al., 2009) compartments were shown to impact the yeast redox homeostasis (Hou et al., 2009). Introduction of an NADH, H^+ oxidase from *Lactobacillus lactis* decreased the intracellular NADH, H^+ concentration and the ethanol yield on batch cultures (Heux et al., 2006). Extra consumption of NADH, H^+ in the mitochondria by introduction of an alternative oxidase from *Streptococcus pneumoniae* (Hou et al., 2009; Vemuri et al., 2007) delayed the shift from respiratory to oxidoreductive metabolism from 0.27 h^{-1} à 0.32 h^{-1} and from 0.21 h^{-1} to 0.24 h^{-1} in productostat and accelerostat cultures respectively (Hou et al., 2009; Vemuri et al., 2007). Similarly, introduction of a mitochondrial NADH, H^+ kinase delayed the shift from 0.21 h^{-1} to 0.24 h^{-1} in accelerostat cultures (Hou et al., 2009). Although the cytosolic and mitochondrial NADH, H^+ concentrations

were not determined, these works showed that NADH, H^+ accumulation in the mitochondria might affect the TCA and therefore lead to the onset of alcoholic fermentation (Hou et al., 2010). Modification of the onset of the Crabtree effect in *S. cerevisiae* depends on the modulation of the reactions involved in the respiratory capacity by a global effector either at the genetic level (Blom et al., 2000; Van Maris et al., 2001) or at the molecular level (Heux et al., 2006; Hou et al., 2009; Hou et al., 2010; Marc et al., 2013). Carbon dioxide is a major compound of the yeast metabolism and is involved as a product or substrate in reactions of the TCA, the anaplerotic pathways and the shunt of the Pyruvate Dehydrogenase that belong to the respiratory capacity (Aguilera et al., 2005a). CO_2 is a highly connected metabolite but its role in the onset of alcoholic fermentation has never been investigated so far.

It has long been known that carbon dioxide or bicarbonate ions supply are required for the yeast growth (Aguilera et al., 2005a) and on the other hand that high dissolved carbon dioxide concentrations have an inhibitory effect on yeast physiology (Chen et al., 1976; Jones and Greenfield, 1982). The inhibitory effect of high CO_2 concentrations has been investigated in fermentative metabolism (Aguilera et al., 2005b; Karl et al., 1997; Kuriyama et al., 1993; Renger, 1991; Thibault et al., 1987), oxido-reductive metabolism (Aguilera et al., 2005b; Belo et al., 2003; Campelo and Belo, 2004; Kuriyama et al., 1993; Nagahisa et al., 2005; Otero Romero, 2009) and oxidative metabolism (Aboka et al., 2012; Aguilera et al., 2005b; Chen et al., 1976; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a). Strikingly, although a vast amount of work has been carried out on CO_2 impact on yeast, there is paradoxically little quantitative data available on the mechanisms underlying this effect (Aboka et al., 2012; Aguilera et al., 2005b; Krook et al., 2004; Mashego, 2005a). The toxicity of CO_2 on yeast cells may be mediated by an anesthesia effect on the cellular membrane (Castelli et al., 1969; Garcia-Gonzalez et al., 2007; Isenschmid, 1995), a decrease of the intracellular pH (Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Kresnowati et al., 2008a; Mashego, 2005b; Orij, 2010; Orij et al., 2012), a mass-action effect on metabolic reactions or a direct inhibition of the activity or the synthesis of key enzymes (Jones and Greenfield, 1982). However to date none of these mechanisms has been proved to explain the CO_2 inhibitory effect.

The purpose of the present work was to investigate the impact of CO_2 on the onset of the Crabtree effect in *S. cerevisiae*. To this end, two carbon-limited chemostats were conducted in the present work: without and with CO_2 enrichment to increase the dissolved CO_2 concentration. Two accelerostats were subsequently carried out from these steady-states to study the transition from respiratory to oxido-reductive metabolism under the non CO_2 enriched and CO_2 enriched conditions. The results were interpreted with a focus on the characterization of the metabolic shift in both conditions.

5.2.3 Material and methods

5.2.3.1 Reactor setup

Cultures were carried out in a stainless-steel 7.0 L bioreactor (B.Braun AG, Melsugen, Germany) with a working volume of 2.0 L. The reactor was jacketed, had a concave bottom, an inner diameter of 16.6 m and four 0.23 m height baffles. It was equipped with one O-ring sparger located at the bottom and 2 six bladed Rushton impellers (external diameter 6.3 cm, 1.5 cm width) placed at 1 and 5.5 cm from the bottom end of the stirring shaft and driven by a 340 W motor. Mass – flow controllers (5850 TR model, Brooks, USA) were used to control the inlet air and CO₂ flow rates.

The temperature was kept at 30.00 °C and the pH was regulated at 5.00 by addition of 2 N NaOH solution. The relative pressure was kept at 0.1 or 0.3 bars. The reactor was equipped with a foam detection system (Sartorius, Germany) and foam formation was prevented by the controlled addition of polypropylene glycol (Sigma-Aldrich, USA). Monitoring and regulation of the variables were carried out using MFCS/ win 2.0 software (Sartorius, Germany).

5.2.3.2 On-line measurements

Inlet and outlet gas compositions were measured using mass spectrometry (Prima 600s model, ThermoFisher, U.K). Analysis were performed every 10s and the time delay between the outlet of the reactor and the gas analyzer was considered in the calculations.

pH was measured using a 32.7 cm vertical probe (Mettler-Toledo, Switzerland). The dissolved O₂ partial pressure, expressed as a percentage of oxygen saturation in the initial medium at operating pressure and temperature, was measured using an 12 cm InPro6800 probe (Mettler-Toledo, Switzerland) located 5.7 cm above the bottom at an inclination of 15°. Data from the pH and dissolved oxygen were recorded every second during the acceleration. The dissolved CO₂ partial pressure was measured using an InPro5000 probe (Mettler-Toledo, Switzerland) but due to drift issues of the probe the dissolved CO₂ was estimated from the CO₂ mole fraction in the exit gas phase (Aguilera et al., 2005b).

5.2.3.3 Analytical procedures

Supernatant sampling was carried out using a cross-flow filtration unit (Applikon, The Netherlands) and a fraction collector (Fraction Collector Frac-100, Pharmacia fine chemicals,

USA) set up in an external recirculation loop operated with a peristaltic pump (Masterflex 77521-57, Cole-Parmer USA). Broth sampling was carried out using a syringe.

Dry cell weight measurements were carried out by filtering a known volume of broth on a 0.45 μm pore-size polyamide filter and drying it to a constant weight at 60°C under a partial vacuum (0.260 bars) during 48h. The biomass composition formula used in the calculations was determined to be $\text{CH}_{1.789}\text{O}_{0.531}\text{N}_{0.1602}\text{P}_{0.018}\text{S}_{0.003}$ (Service Central d'Analyse du C.N.R.S, Villeurbanne, France) with 6% ashes corresponding to a molar weight of 25.84 g.Cmole^{-1} showing reasonable agreement with the biomass composition reported by (Lange and Heijnen, 2001).

glucose, ethanol, acetate, succinate, pyruvate and glycerol concentrations in the broth and in the feed were determined using H.P.L.C as described in (Alfenore et al., 2002). Ethanol and acetate low concentrations in the broth were also determined spectrophotometrically using commercial enzymatic kits (R-Biopharm, Germany). Glucose concentration in the broth was also determined using an YSI 2340 analyzer (Yellow Springs Instruments, Ohio, USA).

5.2.3.4 Micro-organism and media

The strain *S. cerevisiae* CEN.PK 113-7D was used in that work (van Dijken et al., 2000).

The following medium was used in all batch and chemostat cultures (concentrations expressed in g.L^{-1}) : glucose, 40.0 ; ethanol 2.0 ; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 12.0 ; KH_2PO_4 , 6.0 ; MgSO_4 , 7 H_2O , 2.0 ; Na_2EDTA , 3.3×10^{-2} ; ZnSO_4 , 7 H_2O , 9.0×10^{-3} ; MnCl_2 , 4 H_2O , 2.0×10^{-3} ; CoCl_2 , 6 H_2O , 6.0×10^{-3} ; CuSO_4 , 5 H_2O , 6.0×10^{-3} ; Na_2MoO_4 , 2 H_2O , 8.0×10^{-3} ; CaCl_2 , 2 H_2O , 9.0×10^{-3} ; FeSO_4 , 7 H_2O , 6.0×10^{-3} ; H_3BO_3 , 2.0×10^{-3} ; d-biotin, 4.0×10^{-3} ; D-L pantothenic acid, 4.0×10^{-3} ; nicotinic acid, 4.0×10^{-3} ; myo-inositol, 50×10^{-3} ; thiamine hydrochloride, 4.0×10^{-3} ; pyridoxine hydrochloride, 4.0×10^{-3} ; para-amino benzoic acid, 0.8×10^{-3} , ampicillin 50×10^{-2} . Chemicals were of the highest analytical grade available. Ethanol was added as a co-substrate to avoid the occurrence of oscillations (Visser et al., 2002). The salt solution was prepared using tap water; the glucose, traces and vitamin and antibiotic solutions were prepared using osmosed water. The salt and glucose solution were sterilized by autoclave; the traces, vitamin and antibiotic were sterilized by filtration.

5.2.3.5 Rate calculation, mass balances and metabolic model

The oxygen consumption rate $r\text{O}_2$ and carbon dioxide production rate $r\text{CO}_2$ were calculated from the mass balances of O_2 and CO_2 for both the liquid phase and the gas phase as described in (Sunya et al., 2012).

Pulse experiments may lead to small variations of the biomass concentrations that may not be accurately quantified using dry cell weight measurement (Taymaz-Nikerel et al., 2011). Therefore the transient total biomass formation rate was calculated from the carbon and degree of reduction balances as described by (Aboka et al., 2012; Sunya et al., 2012). Total biomass corresponds to the sum of the active biomass, trehalose and glycogen. The total biomass formation rate was calculated as the mean value of the two values calculated using the two balances (Aboka et al., 2012). Both values showed excellent agreement (data not shown). Variations of the total biomass degree of reduction value during the transient were neglected as reported in (Aboka et al., 2012). Glycogen and trehalose rates were calculated from their mass balances as described by (Aboka et al., 2012) and integrated over time to yield the amount consumed during the transient. The data were checked for consistency (van der Heijden et al., 1994) and metabolic fluxes and Y_{ATP} values were calculated from the reconciled rates using a MFA model previously described (Pagliardini et al., 2010).

5.2.3.6 Chemostat and accelerostat

The strain was cultivated in Petri dishes using YPD (Yeast extract 10 g.L⁻¹, Bacto-peptone 20 g.L⁻¹, D-glucose 20 g.L⁻¹) -agar medium. Pre-cultures were grown from a colony in 10 mL tube of YPD medium at 30.0°C for 12h on a rotary shaker (150 rpm). Each tube was transferred to a 1 L Erlenmeyer flask with 190 mL defined synthetic medium (pH 5.0) which was incubated medium at 30.0°C for 12h on a rotary shaker (150 rpm). This pre-culture was used to inoculate the reactor.

The culture was started on batch mode and the feed was started after consumption of the accumulated ethanol. Cultures were considered to be at steady state after at least five residence times and if no significant changes in the physical and state variables occurred. The feed medium was supplied using a peristaltic pump (520-DU model, Watson-Marlow, U.K) and the feed reservoir weight was recorded (scale CH1NE-64E0-S, Sartorius, Germany). The chemostat cultures were performed on a weight-controlled mode at a dilution rate of 0.14 h⁻¹ to avoid the occurrence of oscillations and high storage sugars content in biomass. The reactor weight was measured (scale CH1NE-64E0-S, Sartorius, Germany) and regulated at a constant value using a peristaltic pump (520-DU model, Watson-Marlow, U.K). Base addition was also monitored by weighing (scale CPA5201, Sartorius, Germany). The mass densities of the feed medium, the base solution and the broth were measured at 30.0°C using a DE40 densimeter (Mettler Toledo,

Switzerland). The cultures were operated at 0.75 vvm and 1500 rpm (equivalent to a power uptake of 38.8 kW.m^{-3} according to (Hughmark, 1980)) to avoid oxygen limitation.

The accelerostat technique is a computer-controlled continuous culture with a smooth change in the dilution rate that allows a fast estimation of the steady-states conditions over a wide range of growth rates (Paalme et al., 1995). The acceleration was started after a steady-state had been obtained and characterized. The acceleration rate was 0.005 h^{-2} which is a value classically used in yeast accelerostat studies (van Dijken et al., 2000; Klein et al., 1999; Marc et al., 2013) and is considered slow enough so that the yeast can adapt to the changing environment (van der Sluis et al., 2001). The dilution rate value was increased from 0.136 h^{-1} to 0.225 h^{-1} in the CO_2 enriched accelerostat and from 0.136 h^{-1} to 0.30 h^{-1} in the accelerostat without CO_2 enrichment.

Two chemostat and accelerostat cultures were conducted in the present work: with and without CO_2 enrichment. CO_2 enrichment was performed by an increase of the CO_2 molar fraction in the inlet aeration gas achieved by mixing pure CO_2 with the airflow. Both pure CO_2 and air flow were controlled with mass flow controllers (5850 TR model, Brooks, USA). Consequently N_2 and O_2 molar fractions in the resulting inlet gas mix were lower than with air. The inlet gas molar composition used for CO_2 enrichment was: 43.486% N_2 , 11.691% O_2 , 44.89% CO_2 , and 0.521% Ar. The CO_2 enrichment was then equivalent to 15.71 mM dissolved CO_2 . The inlet gas flow-rate flow was similar in both accelerostat.

5.2.4 Results

5.2.4.1 Steady-states

The steady-states obtained without (SS1) and with CO_2 enrichment (SS2) are presented in Table 1. CO_2 enrichment of the culture resulted in higher dissolved CO_2 concentrations: 17.198 mM compared to 1.426 mM in the reference culture without CO_2 enrichment (Tableau 38). The carbon and redox balances were found to be close to 100 %, which prove the data consistency. The respiratory coefficient was close to 1 in all cultures and only traces amounts of glucose and ethanol concentrations were found (Tableau 38) indicating that the yeast metabolism was fully oxidative.

The steady-states reached with CO_2 enrichment was characterized by lower biomass yield, higher respiration rate, glucose consumption rate and ethanol consumption rate when compared with the steady-state without CO_2 enrichment. Succinate production was observed in the CO_2 -enriched steady state representing 2.84 % of the overall Cmole balance.

Tableau 38. Comparison of the steady states with or without CO₂ enrichment.

SS	B-SS2	B-SS1
D (h ⁻¹)	0.136	0.136
[CO ₂ l] (mM)	1.426 ± 0.018	17.198 ± 0.018
[X] (g _{DW} .L ⁻¹)	19.643 ± 0.713	17.003 ± 0.198
q _{glucose} (mmole.g _X ⁻¹ .h ⁻¹)	- 1.434 ± 0.052	- 1.661 ± 0.041
q _{ethanol} (mmole.g _X ⁻¹ .h ⁻¹)	- 0.301 ± 0.011	- 0.348 ± 0.005
qO ₂ (mmole.g _X ⁻¹ .h ⁻¹)	- 3.810 ± 0.046	- 4.655 ± 0.027
qCO ₂ (mmole.g _X ⁻¹ .h ⁻¹)	3.778 ± 0.065	4.587 ± 0.022
q _{succinate} (mmole.g _X ⁻¹ .h ⁻¹)	0.000 ± 0.000	0.082 ± 0.013
Carbon recovery (%)	99.29 ± 0.71	95.62 ± 0.72
Redox recovery (%)	100.51 ± 0.65	94.38 ± 0.41
RQ	0.991 ± 0.016	0.9853 ± 0.017
R _{C,X} (Cmole _X .Cmole _C ⁻¹)	0.584 ± 0.021	0.505 ± 0.012
[Glucose] (mg.L ⁻¹)	0.05 ± 0.00	0.05 ± 0.00
[Ethanol] (mg.L ⁻¹)	1.84 ± 1.25	26.05 ± 11.30
[Acetate] (mg.L ⁻¹)	1.35 ± 0.43	2.41 ± 0.46
Intracellular [K ⁺] (mM)	251 ± 10	251 ± 6
Intracellular [Mg ²⁺] (mM)	44 ± 3	54 ± 2

N.D Non Determined

5.2.4.2 Accelerostat without CO₂ enrichment

The accelerostat without CO₂ enrichment was conducted from 0.136 h⁻¹ to 0.300 h⁻¹ with an acceleration rate of 0.005 h⁻². An overview of the changes of the variables and the kinetic parameters over the acceleration is presented in Figure 38. The overall carbon and degree of reduction balances were closed at 95.98 % and 94.67 % respectively over the acceleration.

Glucose concentration remained under 0.1 g.L⁻¹ during the acceleration but the concentration rose from D = 0.272 h⁻¹. Acetate concentration remained under 5 mg.L⁻¹ until D = 0.234 h⁻¹, rose from 44 mg.L⁻¹ at D = 0.234 h⁻¹ to 65 mg.L⁻¹ at D = 0.264 h⁻¹ and stayed constant until the end of the acceleration. Correspondingly the acetate specific production rate sharply increased from D = 0.234 h⁻¹. Succinate and pyruvate excretion were not detected during the acceleration and small amounts (<0.1 g.L⁻¹) of glycerol were produced from D = 0.287 h⁻¹ (data not shown). Ethanol residual concentration remained under 0.2 g.L⁻¹ during most of the acceleration but started to accumulate from D = 0.260- 0.264 h⁻¹. The ethanol specific consumption rate increased from the start of the acceleration to D = 0.26 h⁻¹ and then decreased. The ethanol specific rate shifted from negative values indicating ethanol consumption to positive values indicating ethanol production at D = 0.279 h⁻¹. This dilution rate was identified as the apparent critical dilution rate under non-CO₂ enriched conditions. The specific glucose consumption rate reached 3.35 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ at the critical dilution rate.

The specific respiration rates increased linearly from the start of the acceleration to D = 0.26 h⁻¹ which was reflected by a RQ value close to unity till D = 0.26 h⁻¹. A slight increase of the specific respiration rates was observed from D = 0.23 h⁻¹ corresponding to the start of acetate excretion. The specific CO₂ production rate kept increasing after D = 0.26 h⁻¹ and eventually reached 9.67

mmole.g_x⁻¹.h⁻¹ at the end of the acceleration. On the other hand the specific O₂ consumption rate increase was less pronounced than the increase of qCO₂ and eventually qO₂ stagnated at 8.65 mmole.g_x⁻¹.h⁻¹. The RQ value slightly increased from D = 0.24 h⁻¹ to D = 0.26 h⁻¹, linearly increased from D = 0.26 h⁻¹ and reached 1.16 at the end of the accélérostat

The biomass concentration remained constant over most of the acceleration but declined from D = 0.23 h⁻¹. Correspondingly, the biomass yield on glucose and ethanol was globally constant over most of the acceleration but declined from D = 0.23 h⁻¹.

5.2.4.3 Accelerostat with CO₂ enrichment

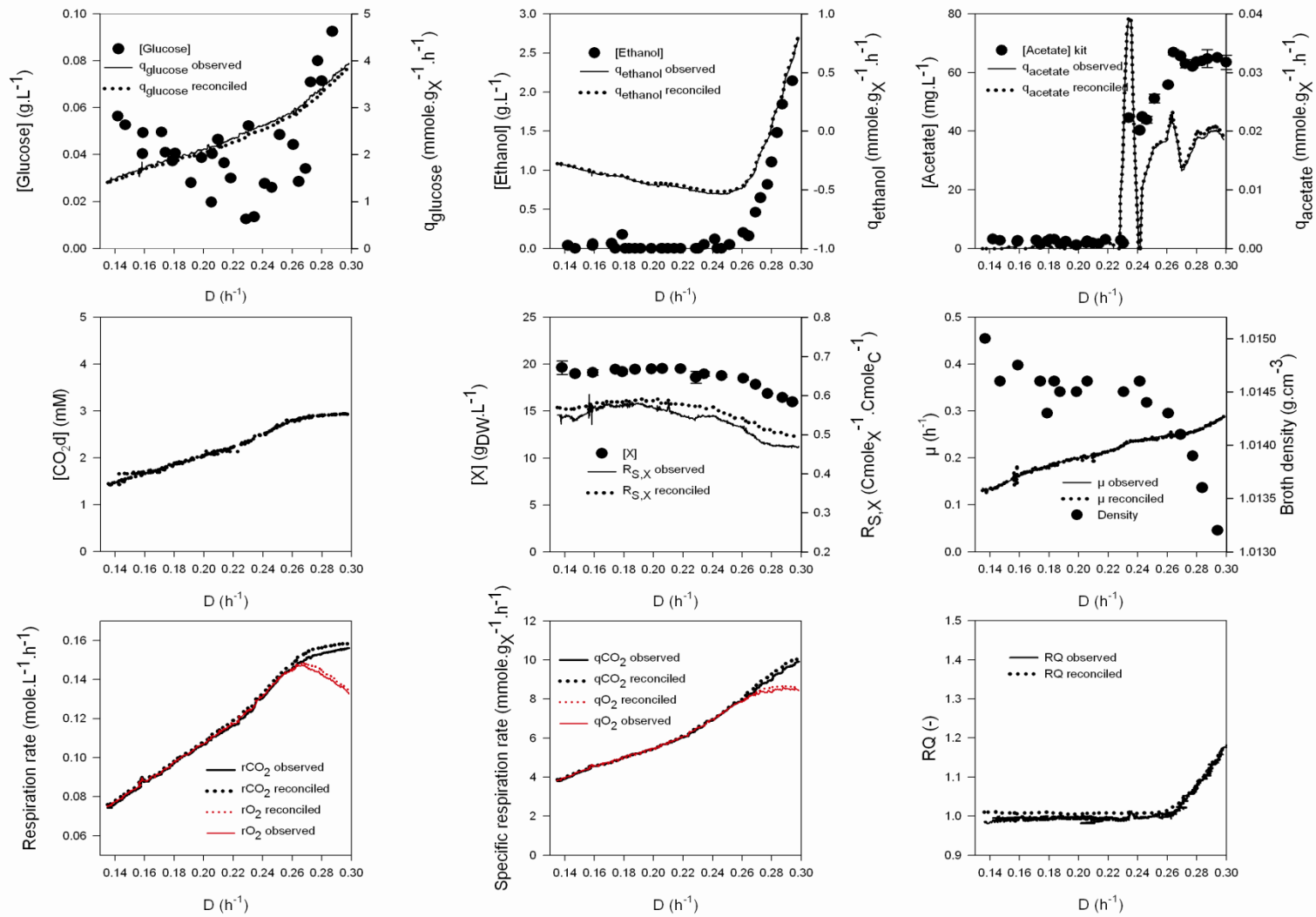
The accelerostat with CO₂ enrichment was conducted from 0.136 h⁻¹ to 0.224 h⁻¹ with an acceleration rate of 0.005 h⁻². An overview of the culture is presented in Figure 39 and Figure 40. The overall carbon and degree of reduction balances were closed at 97.56 % and 97.94 % respectively over the acceleration.

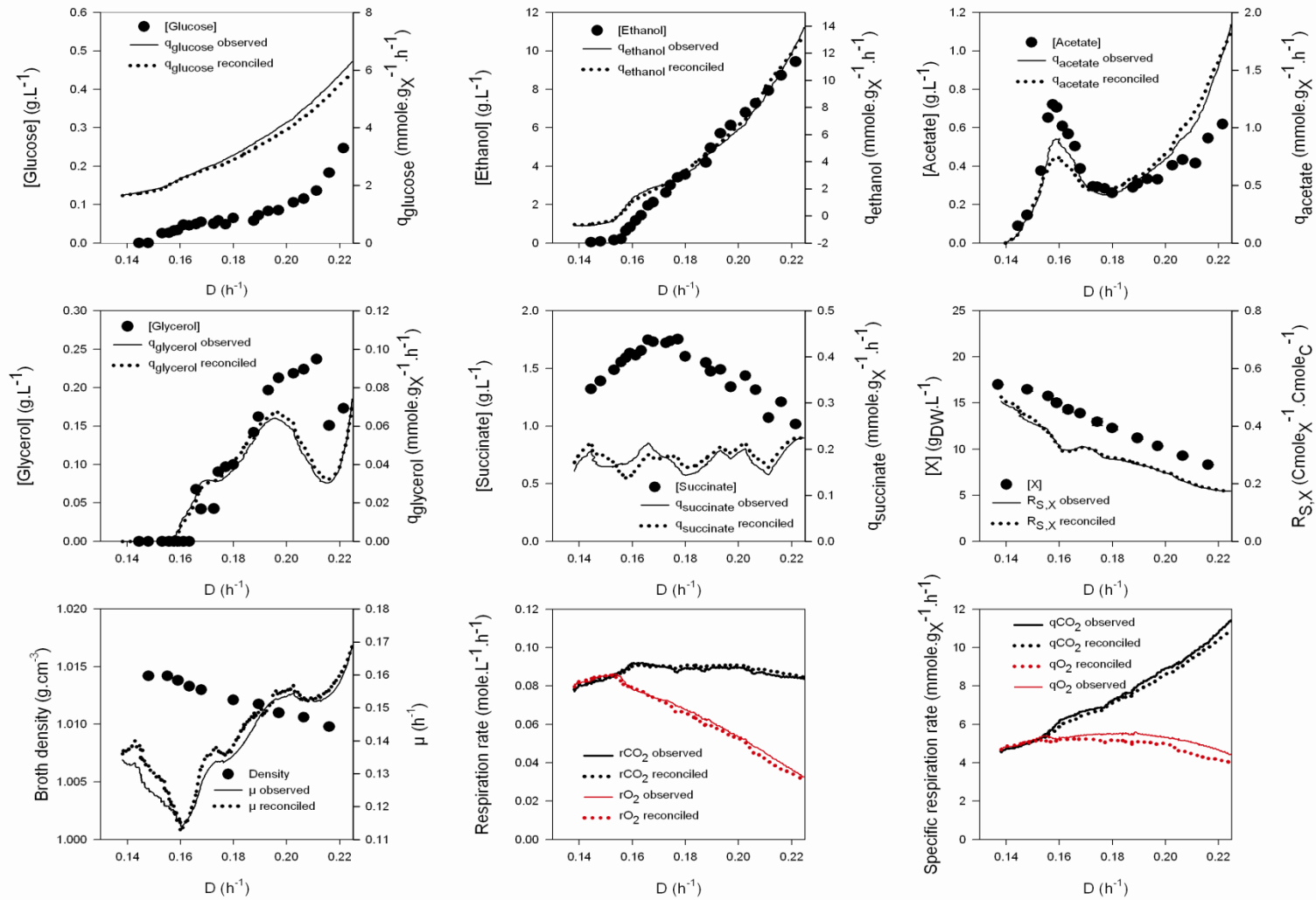
Glucose concentration remained under 0.2 g.L⁻¹ during most of the acceleration and the maximum value reached at the end of the accelerostat was 0.25 g.L⁻¹. Acetate concentration rose sharply from the start of the acceleration and reached a first peak at D = 0.157 h⁻¹ before decreasing and increasing again from 0.180 h⁻¹ up to a second maximum. The specific acetate production rate showed a peak at D = 0.157 h⁻¹ and then a continuous increase after D = 0.18 h⁻¹. The specific succinate production rate remained globally constant during the acceleration. Glycerol concentration remained low during the acceleration but the specific glycerol production rate increased with the dilution rate. Pyruvate was also detected in small amounts (< 0.3 g.L⁻¹) for the highest dilution rates (data not shown). Ethanol residual concentration remained under 0.1 g.L⁻¹ from the start of the acceleration till D = 0.153 h⁻¹ and then increased linearly. The final ethanol concentration was 10.48 g.L⁻¹ at D = 0.226 h⁻¹. The specific ethanol consumption rate decreased from D = 0.153 h⁻¹ and the specific ethanol rate shifted from negative values to positive values at D = 0.155 h⁻¹. This apparent critical dilution rate corresponds to the start of ethanol production and then to the onset of oxido-reductive metabolism under CO₂-enrichment conditions. The specific glucose consumption rate reached 1.95 mmole.g_x⁻¹.h⁻¹ at the critical dilution rate.

The specific respiration rates increased linearly from the start of the acceleration to D = 0.153 h⁻¹ which was reflected by a RQ value close to unity. The specific O₂ consumption rate increase was subsequently less pronounced than the increase of the specific CO₂ production rate yielding a sharp increase of the RQ value from 1.0 at D = 0.155 h⁻¹ to 3.0 at the end of the acceleration.

The q_{O_2} value remained stable around $5.2 \text{ mmole mmole.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ from $D = 0.153 \text{ h}^{-1}$ to $D = 0.172 \text{ h}^{-1}$ before decreasing.

The biomass concentration decreased from the start of the acceleration which was reflected by a decrease of the broth specific gravity. This decrease could also be related to the increase of ethanol concentration in the broth from $D = 0.153 \text{ h}^{-1}$. The specific growth rate decreased from the start of the acceleration down to 0.115 h^{-1} at $D = 0.159 \text{ h}^{-1}$ and then increased over the rest of the acceleration.


 Figure 38. Overview of the accelerostat carried out without CO_2 enrichment.


 Figure 39. Overview of the accelerostat carried out with CO_2 enrichment.

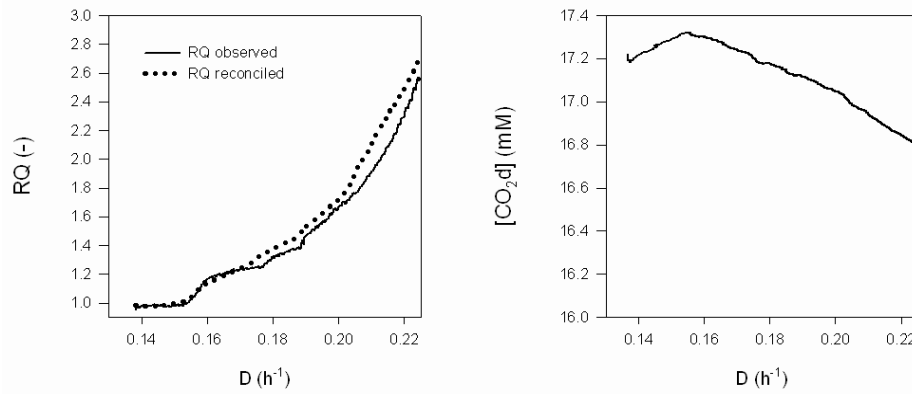


Figure 40. Overview of the accelerostat carried out with CO₂ enrichment (continued).

5.2.5 Discussion

5.2.5.1 High dissolved CO₂ concentration impacted the cellular adaptability

The higher CO_{2l} concentrations obtained in case of CO₂ enrichment resulted in lower biomass yield, higher specific respiration rates, higher specific glucose and ethanol consumption rate and succinate excretion in steady-state conditions when compared with the steady-state without CO₂ enrichment (Tableau 38). These results are consistent with the 24% decrease of biomass yield, the 74% increase of the oxygen specific consumption rate reported and the excretion of succinate ($q_{\text{succinate}} = 0.13 \text{ mmole.g}_X^{-1}.\text{h}^{-1}$) reported in comparable conditions for a higher CO₂ enrichment (79% in the inlet gas corresponding to 22.30 mM dissolved CO₂) (Aguilera et al., 2005b).

In the accelerostat without CO₂ enrichment the specific growth rate followed the increasing dilution rate from the start of the acceleration to $D = 0.24 \text{ h}^{-1}$. A slight deviation was subsequently observed as the experimentally measured growth was lower than the dilution rate, the maximal deviation being 8% at the critical dilution rate $D = 0.279 \text{ h}^{-1}$. Therefore the accelerostat culture without CO₂ enrichment was performed in quasi steady-state growth conditions. The small deviation between μ and D after $D = 0.24 \text{ h}^{-1}$ might be related with acetate excretion in the medium which was observed from $D = 0.234 \text{ h}^{-1}$ whereas ethanol started to accumulated only from $D = 0.260\text{-}0.264 \text{ h}^{-1}$ and the shift from respiratory to oxido-reductive metabolism was reached at $D = 0.279 \text{ h}^{-1}$. This earlier excretion of acetate compared to ethanol formation was also observed in chemostat cultures of *S. cerevisiae* CBS 8066 (Postma et al., 1989; Verduyn, 1992) and accelerostat culture of the strain S288C (Kasemets et al., 2003). Although the extracellular concentration of acetate remained small ($<65 \text{ mg.L}^{-1}$) it may exert an uncoupling effect. The biomass to oxygen yield $R_{O_2, X}$ was $27.76 \pm 0.52 \text{ mmole}_{O_2}.\text{g}_X^{-1}$ from the start of the

acceleration to $D = 0.23 \text{ h}^{-1}$ when no acetate was present but increased after $D = 0.23 \text{ h}^{-1}$ up to reach $30.39 \text{ mmole}_{\text{CO}_2} \cdot \text{g}_X^{-1}$ at $D = 0.26 \text{ h}^{-1}$ in presence of acetate and absence of ethanol.

Under CO_2 enrichment the specific growth rate decreased from the start of the acceleration down to 0.122 h^{-1} at the critical dilution rate $D_c = 0.155 \text{ h}^{-1}$ and subsequently increased after the metabolic shift occurred although not recovering the D value. Therefore no quasi steady state growth was observed in presence of CO_2 enrichment contrary to what was observed without CO_2 enrichment at the same acceleration rate. These results clearly showed that yeast cells exposed to high dissolved CO_2 concentration could not keep up with the increasing dilution rate whereas non CO_2 stressed yeast could. There was therefore an uncoupling between the change in the environment (i.e the smoothly increasing dilution rate) and the cellular response to this change: high dissolved CO_2 concentration impacted the yeast cells adaptability. The remaining question is: how does the high dissolved CO_2 concentration make the yeast cells less adaptable to a smooth continuous change in the dilution rate?

5.2.5.2 CO_2 impacted the yeast energetics

The higher respiration rate and lower biomass yield observed in the CO_2 -enriched steady state culture suggested that high dissolved CO_2 concentrations created an energy drain which was confirmed by lower Y_{ATP} values: $12.1 \text{ g}_X \cdot \text{mole}_{\text{ATP}}^{-1}$ and $9.9 \text{ g}_X \cdot \text{mole}_{\text{ATP}}^{-1}$ with and without CO_2 enrichment. Therefore high dissolved CO_2 exert an uncoupling-like effect on yeast metabolism in the steady-state cultures as already suggested by (Aguilera et al., 2005b). The energy drain observed in the CO_2 enriched culture may originate from the energy required to cope with the stresses caused by high dissolved CO_2 concentrations and maintain the cellular homeostasis. Several mechanisms have been thought to contribute the toxic effect of CO_2 on yeast cells such as an “anesthesia” effect on the cellular membrane (Castelli et al., 1969; Garcia-Gonzalez et al., 2007; Isenschmid, 1995), a decrease of the intracellular pH (Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Kresnowati et al., 2008a; Mashego, 2005b; Orij, 2010; Orij et al., 2012), a mass-action effect on metabolic reactions or a direct inhibition of the activity or the synthesis of key enzymes (Jones and Greenfield, 1982). However to date none of the mentioned mechanisms has been proved to explain the CO_2 inhibitory effect on yeast.

The Y_{ATP} for the accelerostat carried out without CO_2 enrichment was globally constant at $12.01 \pm 0.34 \text{ g}_X \cdot \text{mole}_{\text{ATP}}^{-1}$ from the start of the acceleration to $D = 0.230 \text{ h}^{-1}$ and subsequently decreased down to $10.44 \text{ g}_X \cdot \text{mole}_{\text{ATP}}^{-1}$ at $D = 0.265 \text{ h}^{-1}$ (Figure 41). This decrease of Y_{ATP} with increasing dilution rate values while the yeast still displayed a fully oxidative metabolism was also observed in (Verduyn, 1992). Under CO_2 enrichment the Y_{ATP} decreased from the start of the acceleration

down to $9.29 \text{ g}_X \cdot \text{mole}_{\text{ATP}}^{-1}$ at $D = 0.16 \text{ h}^{-1}$ and then increased over the rest of the acceleration (Figure 41).

The decrease of the Y_{ATP} value in the oxidative phase of the CO_2 -enriched accelerostat was of the same order of magnitude than the decrease observed without CO_2 enrichment. This decrease may be related to the uncoupling effect exerted by weak acids such as acetate and succinate. However the acetate concentration values and the q_{acetate} values observed in the oxidative phase of the CO_2 -enriched accelerostat were up to 11 and 18 times higher than the values observed in the accelerostat without CO_2 enrichment respectively. Consequently acetate uncoupling may not be responsible of the Y_{ATP} decrease observed in the oxidative phase of both accelerostats as already suggested by (Verduyn, 1992). Furthermore, no succinate excretion was observed in the accelerostat without CO_2 enrichment whereas the $q_{\text{succinate}}$ was around $0.2 \text{ mmole} \cdot \text{g}_{\text{DW}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ but the decrease of the Y_{ATP} value in the oxidative phase of both accelerostats was similar. Therefore the uncoupling action of succinate may be neglected although no data could be found to support this hypothesis.

The energy sink created by the high dissolved CO_2 concentration may represent a burden for the cellular machinery and may therefore contribute to the poor cellular adaptability observed during the CO_2 enriched accelerostat.

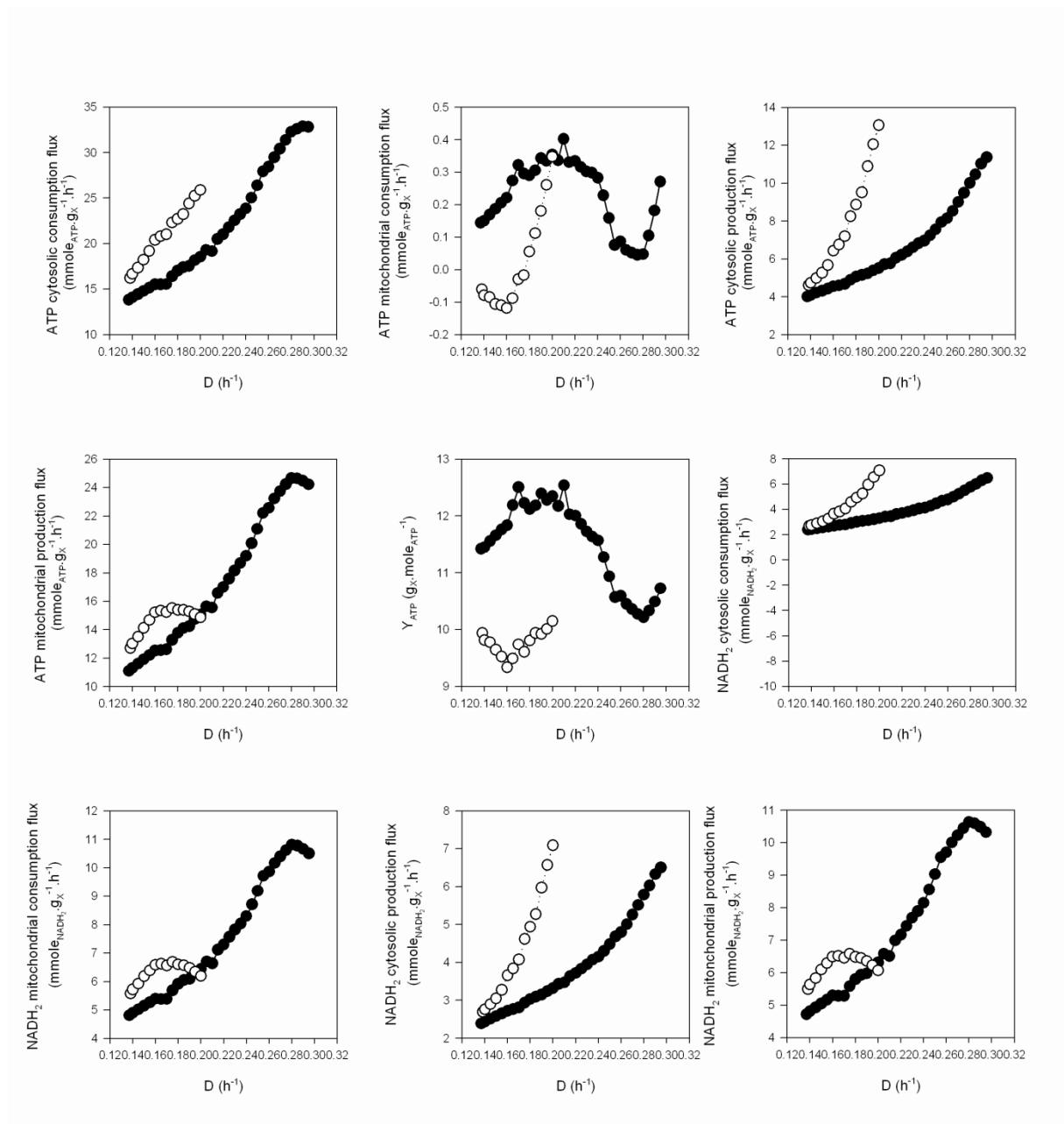


Figure 41. Calculated ATP and NADH, H⁺ production and consumption fluxes in the cytosol and the mitochondria over the accelerations.

5.2.5.3 CO₂ created an osmotic stress

The cytosolic and mitochondrial concentrations of CO₂ and bicarbonate ions were calculated for both accelerostats assuming that the cytosolic and mitochondrial CO₂ concentrations were at equilibrium with the broth concentration, the cytosolic pH value was 6.6 (Kresnowati et al., 2007) and the mitochondrial pH value was 7.3 (Orij et al., 2009). The steady-states cytosolic bicarbonate ions concentrations were 7.2 and 87.4 mM in the non-CO₂ enriched and CO₂ enriched cultures respectively. Similarly, the steady-state mitochondrial bicarbonate ions concentrations were 36.4 and 2231 mM in the non-CO₂ enriched and CO₂ enriched accelerostats respectively. The increase

of the turgor pressure caused by high cytosolic bicarbonate concentrations was calculated using Van't Hoff's law and assuming that the intracellular activity coefficient was one. The extra turgor pressure created by cytosolic bicarbonates ions reached 0.22 MPa in the CO₂ enriched steady-state culture and would therefore be significant as the yeast turgor pressure was estimated to be 0.6 MPa (Schaber et al., 2010).

The high bicarbonate concentrations under CO₂ enriched conditions may also exert an inhibitory effect on key enzymes. For instance 70% inhibition of the activity of the cytosolic enzyme pyruvate kinase was reported for bicarbonate concentration of 70 mM (Jones and Greenfield, 1982) whereas the inhibition of mitochondrial enzyme succinate dehydrogenase started for bicarbonates concentrations as low as 20 mM in rat liver mitochondria (Swierczynski and Davis, 1978; Wanders et al., 1983).

Interestingly the specific succinate production rate remained globally constant during the acceleration which may be related to the fact that the dissolved CO₂ concentration did not change significantly (Figure 40, maximal variation of -2.32% compared to the steady-state value). Succinate production in CO₂ enriched conditions may therefore be related to the inhibition of the succinate dehydrogenase by high mitochondrial bicarbonate ions concentration as suggested in (Marc et al., 2013; Zelle et al., 2010). Succinate may also contribute to the osmotic stress created by CO₂ enrichment. The accumulation factor for succinate was calculated to be 289 assuming this weak acid is distributed according to the pH difference between the cytosol and the broth (Verduyn et al., 1990). This factor yields a steady-state cytosolic concentration of 2682 mM in CO₂-enriched conditions corresponding to an extra turgor pressure of 6 MPa.

Such high intracellular concentrations of bicarbonate ions and succinate would have dramatic consequences on the yeast metabolism (Piper et al., 2001; Ullah et al., 2012) and are therefore unlikely as the cells would adapt to reduce the intracellular accumulation of those compounds. The active transporter Pdr12p has been suggested to contribute to the export of the anion form of weak acids but create futile cycle and energy dissipation (Piper et al., 2001). Long-term defense mechanisms may include modifications of the permeability of the plasma membrane (Kresnowati et al., 2008c) and / or decrease of the cytosolic pH to reduce the intracellular bicarbonates and weak acids accumulation. The mechanisms used by the cells to cope with the potential accumulation of bicarbonate ions and succinate may contribute to the decrease of the Y_{ATP} value observed in the CO₂-enriched culture.

5.2.5.4 CO₂ impacted the critical dilution rate

Without CO₂ enrichment the critical dilution rate was determined at 0.279 h⁻¹ using the accelerostat technique corresponding to a critical specific growth rate of 0.256 h⁻¹. This shift-value was within the ranges of other values reported in the literature for cultures of the strain CEN.PK 113-7D on glucose : 0.30 h⁻¹ (van Hoek et al., 1998; Van Maris et al., 2001; Overkamp et al., 2000), in between 0.28 h⁻¹ and 0.30 h⁻¹ (Bauer et al., 1999), 0.28 h⁻¹ (Agrimi et al., 2011) or 0.26 h⁻¹ (Herwig and von Stockar, 2002) for chemostat cultures; 0.262 h⁻¹ (Klein et al., 1999), 0.27 h⁻¹ (van Dijken et al., 2000) and 0.24 h⁻¹ (Féria-Gervasio, 2008; Marc et al., 2013) for accelerostat cultures. The corresponding maximum qO₂ value was 8.65 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ which is close to values reported in the literature for the strain CEN.PK 113-7D on glucose : 8.8 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ (van Hoek et al., 1998), 8.6 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ (Van Maris et al., 2001) and 8.0 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ (Herwig and von Stockar, 2002) for chemostat cultures; 7.2-8.1 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ (Klein et al., 1999) and 7.0 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ (Féria-Gervasio, 2008) for accelerostat cultures. Similarly, the glucose consumption rate observed at the apparent critical dilution rate was 3.35 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹, which is close to values reported in other studies : 3.45 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ for the strain H1022 in accelerostat cultures (Rieger et al., 1983), 4.0 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ in chemostat cultures (Agrimi et al., 2011), 3.0 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ in accelerostat technique (Féria-Gervasio, 2008) and 2.5-3.3 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ for (Huberts et al., 2012).

During the accelerostat carried out under CO₂ enrichment the onset of the oxido-reductive metabolism occurred at a dilution rate D_c = 0.155 h⁻¹ corresponding to a specific growth rate of 0.124 h⁻¹.

The onset of alcoholic fermentation in Crabtree-positive yeast has been linked to a limited respiratory capacity above a critical glucose uptake rate (Alexander and Jeffries, 1990; Rieger et al., 1983; Sonnleitner and Käppeli, 1986). Under CO₂ enriched conditions the specific oxygen consumption rate and the specific glucose consumption rate were 5.15 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ and 1.95 mmole.g_X⁻¹.h⁻¹ respectively at the critical dilution rate. The qO₂ value was lower than the one obtained at the critical dilution rate in the non CO₂ enriched accelerostat pointing out that the onset of alcoholic fermentation in *S. cerevisiae* may not be caused by a limited capacity of the mitochondrial respiratory chain as suggested by (Féria-Gervasio et al., 2008; Van Urk et al., 1990; Verduyn et al., 1992).

The role of the redox homeostasis in the onset of the Crabtree effect in *S. cerevisiae* has recently been underlined (Heux et al., 2006; Hou et al., 2009; Hou et al., 2010; Vemuri et al., 2007). NADH₂ accumulation in mitochondria has been suggested to impair the TCA cycling and to

explain the start of alcoholic fermentation (Hou et al., 2010). To get insight into the triggering of the metabolic shift the consumption and production fluxes in both the cytosol and mitochondria were calculated from the MFA results for the highly connected metabolites NADH_2 (Figure 41) as proposed by (Verduyn, 1992). For the CO_2 -enriched culture the rates values were calculated using the specific growth rate and not the dilution rate. The transition from respiratory to oxidoreductive metabolism occurred at cytosolic NADH, H^+ production/consumption fluxes of $3.26 \text{ mmole.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ and $5.77 \text{ mmole.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ with and without CO_2 enrichment respectively, at mitochondrial NADH, H^+ production/consumption fluxes of $6.38 \text{ mmole.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ and $10.80 \text{ mmole.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ with and without CO_2 enrichment respectively. Consequently, the metabolic shift occurred at lower cytosolic and mitochondrial NADH, H^+ fluxes under CO_2 enrichment. These results suggested either that the mitochondrial and cytosolic NADH, H^+ oxidizing capacities may not be instrumental in explaining the onset of alcoholic fermentation in *S. cerevisiae* or that these capacities were lowered in CO_2 -enriched conditions. The low excretion of glycerol in both accelerostats pointed out that NADH, H^+ cytosolic oxidizing capacity may not a key-step in the metabolic shift as cytosolic excess NADH, H^+ is generally oxidized through glycerol production (Overkamp et al., 2000). Consequently, neither a limited capacity of the mitochondrial respiratory chain nor the cytosolic redox balances may be related with the onset of alcoholic fermentation in these two accelerostats. However a major drawback of our analysis is that the flux results cannot predict the $\text{NAD}^+ / \text{NADH}, \text{H}^+$ ratio in cytosol and mitochondria which is the variable affecting the metabolism. Development of new methods for the direct measurement of these ratios is required to confirm the role of the redox balance in the onset of the Crabtree effect. Furthermore, the MFA methodology assumes quasi steady-state growth conditions which were not reached in the CO_2 -enriched culture.

5.2.6 Conclusion

In this work we demonstrated that high dissolved CO_2 concentrations impacted the cellular adaptability to changes in their environment as a CO_2 enriched culture (17 mM dissolved CO_2) could not cope with a small continuous increase of the feeding rate whereas a non CO_2 enriched culture could. The factors that may explain poor cellular flexibility were subsequently investigated. We suggested that the high dissolved CO_2 concentration reached under CO_2 enrichment conditions dramatically impacted the yeast energetics as the Y_{ATP} value was lower in the CO_2 enriched culture. We pointed out that high dissolved CO_2 concentration may create a significant build-up of intracellular bicarbonate ions and weak acids that may affect the yeast homeostasis through osmotic stress and specific enzyme inhibition. Although no clear conclusion

could be drawn it was suspected that the energy sink created by the high dissolved CO₂ concentration may alter the cellular ability to adapt to a changing environment. Finally we investigated the transition from oxidative to oxido-reductive metabolism with and without CO₂ enrichment and we showed that high CO₂ concentration modified the onset of the metabolic shift.

This work revealed the unsuspected impact of carbon dioxide on the cellular adaptability and the onset of the Crabtree effect in *S. cerevisiae*. It may therefore be of interest for intensive cultures where high dissolved CO₂ concentrations can be reached due to the high CO₂ production rate and high hydrostatic pressure in industrial scale vessels.

5.3 Récapitulatif des résultats

- Pour une culture en accélérostat en absence d'enrichissement en CO₂ la proportionnalité entre le taux de croissance et le taux de dilution valide l'hypothèse de quasi – régime stationnaire. La transition respiro-fermentaire est atteinte pour un taux de dilution critique de $D_c = 0.279 \text{ h}^{-1}$ correspondant à un taux de croissance critique de 0.256 h^{-1} . Les vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de glucose sont alors de 8.65 et de $3.35 \text{ mmole.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement. Ces résultats sont en adéquation avec ceux décrits dans la littérature.
- En présence d'un enrichissement en CO₂ (concentration en CO₂ dissous de 17 mM), de façon inattendue le taux de croissance n'évolue pas de la même façon que le taux de dilution au cours de l'expérimentation : l'hypothèse de quasi- régime stationnaire n'est donc pas vérifiée pour cette expérimentation. Pour des cellules exposées à une concentration élevée en CO₂ dissous le potentiel anabolique n'est pas en mesure de s'adapter immédiatement à l'accélération du débit d'alimentation imposé par la stratégie de culture. Le CO₂ impacte donc la flexibilité métabolique de la levure.
- Différents scénarii ont été envisagés pour expliquer cette perte d'adaptabilité des cellules en présence d'une concentration élevée en CO₂ dissous. Il a été calculé que le CO₂ impacte l'énergétique cellulaire car le rendement Y_{ATP} lors d'une accélération en présence d'un enrichissement en CO₂ est inférieur à celui obtenu sans enrichissement. De plus, les concentrations intracellulaires des ions hydrogénocarbonates et du succinate seraient plus élevées dans le cas d'un enrichissement CO₂ ce qui pourrait causer un stress osmotique et une inhibition spécifique de certaines enzymes. Les dépenses d'énergie nécessaires pour maintenir l'homéostasie cellulaire en présence du stress CO₂ pourraient contribuer à expliquer les difficultés des cellules à amortir les changements de l'environnement.
- En présence d'un enrichissement CO₂ la bascule métabolique se produit pour un taux de dilution de $D_c = 0.155 \text{ h}^{-1}$ correspondant à un taux de croissance de 0.124 h^{-1} . Les vitesses spécifiques de consommation d'oxygène et de glucose au taux de dilution critique sont de 5.15 et de $1.95 \text{ mmole.g}_x^{-1}.\text{h}^{-1}$ respectivement. Le CO₂ pourrait donc diminuer le taux de dilution critique chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant l'impact du CO₂ sur la transition respiro-fermentaire est difficile à analyser en raison i) de la superposition du stress causé par le CO₂, du stress osmotique potentiellement causé par les ions hydrogénocarbonates et le succinate, des stress acides potentiellement causés par l'acétate et le succinate ii) de la perte de flexibilité cellulaire causé par le CO₂ qui complique l'interprétation des résultats obtenus.

6. Discussion générale et perspectives

Le développement des procédés biotechnologiques impose la compréhension des interactions entre phénomènes biologiques et phénomènes physiques ayant lieu dans les réacteurs industriels dans un environnement caractérisé par des paramètres physico-chimiques et rhéologiques. A ce titre le dioxyde de carbone est un composé produit par le métabolisme de la levure et impliqué dans des échanges interphasiques (biomasse / liquide et liquide / gaz). L'impact du dioxyde de carbone sur le métabolisme de la levure et les mécanismes de transfert de ce composé sont cependant mal connus.

L'objectif général de ce travail de doctorat était l'étude de l'impact du dioxyde de carbone sur la physiologie et le métabolisme de la levure *S. cerevisiae*, en particulier son impact sur le catabolisme oxydatif du glucose et son rôle dans le déclenchement de la transition respiro-fermentaire. La concentration en dioxyde de carbone dissous dans la phase liquide dépend de la production de CO_2 par le métabolisme cellulaire, de la dynamique des phénomènes de transfert et des équilibres dynamiques avec les espèces du système carbone inorganique total. Le dioxyde de carbone est ainsi au cœur des interactions entre phénomènes biologiques et phénomènes physiques de transfert existant au sein d'un fermenteur. La problématique de ce travail de doctorat impose donc une approche couplée entre physiologie microbienne et génie des procédés.

Au cours de ce travail nous nous sommes d'abord intéressés à la maîtrise de l'environnement du microorganisme, ce qui implique la connaissance de la concentration en CO_2 dans la phase liquide et donc la caractérisation du transfert liquide / gaz. Dans un second temps nous avons caractérisé la réponse physiologique de la levure à des variations dynamiques de l'environnement gazeux. Dans un troisième temps, le point critique d'une culture de *S. cerevisiae* en mode oxydatif étant d'éviter une bascule vers le métabolisme oxydo-réductif, il semblait opportun d'investiguer dans quelle mesure le CO_2 pouvait impacter sur le déclenchement de l'effet Crabtree. Les expérimentations ont été réalisées dans l'environnement contrôlé et maîtrisé de réacteurs en conduite fed-batch, chemostat et accelerostat. Nous allons ici résumer les principaux résultats originaux obtenus, apporter des éléments de réponse aux questions scientifiques formulées à la fin de l'état de l'art et dégager des perspectives pour de nouvelles investigations.

Comment décrire le transfert liquide / gaz du dioxyde de carbone en conditions de culture microbienne intensive ?

Le transfert liquide / gaz du CO_2 est classiquement décrit par analogie avec le transfert gaz / liquide de l'oxygène et la concentration CO_2 dissous dans le moût est calculée à partir de la mesure de la fraction molaire en CO_2 dans les gaz de sortie et de la connaissance du coefficient

volumétrique de transfert gaz / liquide de l'O₂ (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977). Nous avons investigué la validité de cette relation en conditions de culture microbienne intensive

Dans un premier temps une étude de modélisation nous a permis de mettre en évidence l'importance du transfert croisé oxygène / dioxyde de carbone selon le modèle diffusionnel. Le temps de séjour des bulles est fonction de leur taille. Les petites bulles atteignent rapidement un équilibre thermodynamique avec la phase gaz alors qu'un gradient de transfert persiste durant toute l'ascension des bulles de grand diamètre. Nous avons montré que l'utilisation du coefficient de transfert volumique du CO₂ ne permet pas toujours de décrire la réalité du transfert du CO₂.

Dans un second temps, une culture aérobie de *S. cerevisiae* a été réalisée selon une conduite fed-batch. Le transfert liquide / gaz du CO₂ et gaz / liquide de l'O₂ ont été caractérisés au cours de la culture par la mesure directe des concentrations de ces composés dans la phase liquide et de leurs fractions molaires dans les gaz de sortie. Nous avons constaté l'existence d'une sursaturation importante de la phase liquide en CO₂ par rapport à la phase gaz. Ce phénomène n'était pas prévisible selon la littérature dans la mesure où les fortes performances de transfert gaz / liquide de l'oxygène devraient entraîner des performances du même ordre de grandeur pour le transfert liquide / gaz du CO₂ et donc à l'absence de sursaturation (Royce and Thornhill, 1991). Ces résultats montrent que la capacité de désorption du CO₂ du moût de fermentation peut être limitée comme suggéré par (Puskeiler et al., 2012; Sieblist et al., 2011).

La simulation des transferts gazeux (O₂ et CO₂) à partir d'un modèle de distribution des tailles de bulle asymétrique (loi log-normale) fait apparaître qu'une sursaturation en CO₂ dans le moût est possible et d'autant plus marquée que l'asymétrie de la distribution est forte. Nous avons alors caractérisé par la modélisation l'évolution des paramètres caractéristiques de la distribution de tailles de bulles au cours de la culture. Les résultats de tailles de bulles et d'asymétrie sont en adéquation avec celles rapportées dans la littérature pour des études en maquette froides.

Le transfert liquide / gaz du CO₂ a été caractérisé pour la première fois lors d'une culture microbienne intensive avec une analyse intégrée des phénomènes biologiques (vitesses de respiration, concentration cellulaire), des phénomènes physiques de transfert (transfert croisé O₂/CO₂) et des paramètres physico-chimiques et rhéologiques et de leur évolution cours de la culture. Le transfert liquide / gaz du CO₂ ne peut être décrit par analogie avec le transfert gaz / liquide de l'oxygène lors d'une culture microbienne comme proposé par (Royce and Thornhill, 1991; Yagi and Yoshida, 1977). Une distribution asymétrique des tailles des bulles entraîne l'existence d'une sursaturation alors même que les performances de transfert sont élevées pour l'O₂.

Une conséquence directe de ces résultats est qu'il est impossible de calculer la concentration en CO_2 dissous dans le moût de fermentation à partir de la connaissance de la fraction en CO_2 dans les gaz de sortie du fermenteur comme rencontré classiquement dans la littérature (Aguilera et al., 2005b; Chen and Gutmanis, 1976; Royce and Thornhill, 1991). Sa quantification précise ne peut être réalisée que par une mesure directe et apparaît indispensable pour les études de physiologie ayant pour but de caractériser quantitativement l'impact du CO_2 sur un micro-organisme.

De plus, nos résultats révèlent un biais pouvant survenir pour la quantification de la vitesse de production de CO_2 ($r\text{CO}_2$) lors de cultures microbiennes. En effet la variation de la concentration en CO_2 dissous étant classiquement calculée en supposant l'équilibre de concentration en CO_2 entre la phase liquide et la phase gaz, les résultats obtenus montrent que cette démarche pourrait sous-estimer ces variations et donc fausser le calcul de $r\text{CO}_2$. Une quantification précise de $r\text{CO}_2$ nécessite donc également la mesure directe de la concentration en CO_2 dissous. En culture continue à pH 5 l'écart entre la vitesse de production de CO_2 calculée en considérant l'équilibre entre la phase liquide et la phase gaz et la vitesse de production de CO_2 calculée à partir de la mesure du CO_2 ne serait toutefois que de l'ordre de 1%. Ce faible écart provient du fait que la sursaturation observée en culture continue était modeste en raison principalement du fort débit de ventilation utilisé.

L'expérimentation utilisée pour l'étude du transfert liquide / gaz du CO_2 a été réalisée en conduite de type fed-batch caractérisée par une forte réactivité biologique et l'utilisation de puissances dissipées et de débits de ventilations élevés afin d'assurer des performances importantes de transfert de l'oxygène. Ce domaine est au cœur de la mise en œuvre industrielle des micro-organismes où des limitations dans les phénomènes de transfert peuvent impacter de façon dramatique l'issue des cultures. Le travail réalisé apporte donc pour la première fois des éléments sur le transfert liquide / gaz du CO_2 dans des conditions permettant une transposition industrielle. Il peut être d'intérêt pour les calculs de montée en échelle (scale-up) où la transposition des K_La pour l'oxygène est couramment utilisée (Junker, 2004; Schmidt, 2005). Une montée en échelle basée uniquement sur le $K_La(\text{O}_2)$ pourrait conduire à sous-estimer une sursaturation du moût en CO_2 et donc à s'exposer à une éventuelle inhibition des micro-organismes. Le CO_2 dissous, dans la gamme de concentration en pouvant être rencontrée dans les réacteurs industriels pourrait avoir un impact sur les performances de la réaction biologique et donc expliquer l'échec de certaines montées en échelle.

Quel est l'impact de la concentration en dioxyde de carbone dissous sur le métabolisme oxydatif de la levure *S. cerevisiae* ?

Dans une seconde partie de ce travail nous nous sommes intéressés à l'impact du dioxyde de carbone dissous sur la levure *S. cerevisiae*. L'effet inhibiteur du CO₂ sur les micro-organismes est connu de longue date et même utilisé comme bactériostatique à l'échelle industrielle (H.P.C.D.). Néanmoins les mécanismes d'action du CO₂ sont encore mal connus et il existe peu d'études quantitatives sur l'impact du CO₂ sur la physiologie de *S. cerevisiae* (Aboka et al., 2012; Aguilera et al., 2005b; Chen and Gutmanis, 1976; Renger, 1991).

Nous avons donc choisi d'étudier la réponse dynamique de la levure soumise à différents incréments de la concentration en CO₂ dissous. Les expérimentations ont été réalisées en culture continue afin de permettre une analyse de la réponse à court-terme et à long-terme de la levure. Les échelons de la concentration en CO₂ dissous correspondent à la gamme de concentration rencontrée en conditions de culture microbienne.

Des incréments de faible amplitude de la concentration en CO₂ dissous (de +2.96 à +17 mM) provoquent une réponse transitoire significative de la levure caractérisée notamment par une augmentation de vitesses spécifique de consommation d'oxygène, une excrétion d'acétate et une baisse transitoire de la consommation d'éthanol, une mobilisation des substances de réserve (glycogène et tréhalose) et une augmentation des concentrations intracellulaires en cations (potassium et magnésium) sur une période d'une heure environ. Cette réponse correspond à une diminution transitoire de la vitesse de formation de biomasse et à une augmentation momentanée de la génération / dissipation d'énergie par le métabolisme cellulaire. Cet effet transitoire n'a pu être relié de façon quantitative à un impact du CO₂ sur le pH intracellulaire bien que cet effet soit souvent envisagé dans la littérature (Baez et al., 2009; Bäumchen et al., 2007; Mashego, 2005a; Orij et al., 2012). Nous avons aussi démontré que sur le long-terme des concentrations élevées en CO₂ dissous créent un puit de dissipation d'énergie entraînant la diminution du paramètre Y_{ATP} proportionnellement à la concentration en CO₂ dissous. De plus, l'excrétion de succinate semble promue par des concentrations élevées en CO₂ dissous laissant supposer un effet inhibiteur des ions hydrogénocarbonates mitochondriaux sur le complexe succinate déshydrogénase. Enfin, nous avons révélé une adaptation cellulaire probable de la levure à de fortes concentrations en CO₂ dissous sans parvenir à identifier les mécanismes à l'origine de cette adaptation.

Des changements modestes de la concentration en dioxyde de carbone dissous peuvent impacter la levure *S. cerevisiae* en métabolisme oxydatif. Le dioxyde de carbone impacte l'énergétique cellulaire en augmentant la génération et la dissipation d'énergie à la fois à

court terme et à long terme. Le dioxyde de carbone dissous peut donc constituer un stress environnemental pour la levure *S. cerevisiae*.

Les expérimentations réalisées complètent les travaux réalisés précédemment sur l'impact à court-terme (Aboka et al., 2012) et à long-terme (Aguilera et al., 2005b) du CO₂ dissous sur la levure *S. cerevisiae*. Notre travail permet de mettre à jour les analogies entre la réponse cellulaire au stress CO₂ et la réponse cellulaire aux acides faibles. Ainsi les différents phénomènes observés à court-terme dans ce travail lors d'un échelon de la concentration en CO₂ dissous sont retrouvés dans le cas d'ajouts pulsé d'acides faibles: mobilisation des sucres de réserve (Faure, 2005; Kresnowati et al., 2008c), entrée d'ions potassium (Faure, 2005; Macpherson et al., 2005), augmentation des vitesses spécifiques de respiration (Faure, 2005; Kresnowati et al., 2008c; Verduyn et al., 1992). De même, à long-terme en chemostat l'ajout continu d'un acide faible provoque une diminution du rendement en biomasse, une augmentation des vitesses spécifiques de respiration (Kresnowati et al., 2008c; Verduyn et al., 1992) et des phénomènes d'adaptation (Kresnowati et al., 2008c). Le CO₂ et les acides faibles provoquent donc une augmentation de la dissipation énergétique à court terme et à long terme. Pour les acides faibles cette dissipation a été reliée aux mécanismes mis en place pour maintenir l'homéostasie cellulaire en réponse au stress causé par les acides notamment i) aux mécanismes actifs d'extrusion des protons mis en place pour maintenir le pH intracellulaire suite à la dissociation intracellulaire de l'acide faible notamment les pompes à protons Pma1p (Faure, 2005; Kresnowati et al., 2008c; Ullah et al., 2012; Ullah et al., 2013; Verduyn et al., 1992) ii) aux mécanismes actifs d'extrusion de la forme dissociée de l'acide afin d'éviter son accumulation intracellulaire notamment le transporteur Pdr12p (Holyoak et al., 1999; Piper et al., 1998; Piper et al., 2001; Ullah et al., 2012) iii) aux mécanismes d'adaptation de la membrane afin de réduire le flux d'entrée de l'acide (Kresnowati et al., 2008c; Piper et al., 2001).

Plusieurs points restent cependant en suspens concernant une action de type acide faible du CO₂. En effet l'impact d'une augmentation de concentration en CO₂ sur le pH intracellulaire a été évalué de façon quantitative par le calcul mais non mesuré. De plus, aucun mécanisme pour l'expulsion des ions hydrogénocarbonates n'a encore été découvert à ce jour alors que l'accumulation intracellulaire de ces ions pourrait être toxique pour la levure. Enfin, une modification de la membrane en cas de stress CO₂ est probable mais peu étudiée (Castelli et al., 1969) et ne semble pas avoir un impact déterminant dans l'effet CO₂ (chapitre 1.3.3.2).

Les incréments réduits de la concentration en CO₂ dissous permettent de représenter les gradients de concentration potentiellement présents dans les réacteurs industriels de grande taille (Baez et al., 2011). Les conclusions issues de ce travail devraient contribuer, en association avec les mécanismes de transfert, à une meilleure prise en compte du dioxyde de carbone dans la phase

de transposition à l'échelle industrielle des procédés de production utilisant la levure *S. cerevisiae* en métabolisme oxydatif.

Quel est l'impact du dioxyde de carbone sur la transition respiro-fermentaire chez la levure *S. cerevisiae* ?

Dans la mise en œuvre des cultures de *S. cerevisiae* en mode oxydatif, un des objectifs est de contrôler un taux de croissance le plus élevé possible afin d'assurer une forte productivité tout en évitant une bascule dans le métabolisme oxydo réductif. Dans la dernière partie de ce travail nous nous sommes intéressés à l'impact du dioxyde de carbone dissous sur la transition respiro-fermentaire en utilisant la technique de l'accélérostat (Paalme and Vilu, 1992).

Les résultats obtenus en présence d'enrichissement CO_2 montrent une perte de la capacité des cellules à supporter des changements de l'environnement en métabolisme oxydatif. Ainsi des cellules soumises à une concentration élevée en CO_2 dissous ne peuvent s'adapter pour faire face à une accélération lente du taux de dilution alors que des cellules non stressées le peuvent.

Les mécanismes pouvant expliquer cette perte d'adaptabilité ont été passés en revue et évalués de façon quantitative. La valeur du paramètre Y_{ATP} lors d'une accélération en présence d'un enrichissement CO_2 est inférieure à la valeur obtenue sans enrichissement ce qui montre qu'une concentration élevée en CO_2 dissous impacte l'énergétique cellulaire. Cette dissipation d'énergie pourrait provenir des dépenses pour faire face au stress CO_2 . En particulier il a été montré par le calcul que les concentrations intracellulaires en ions hydrogénocarbonate et en acide faible succinate pourraient être importantes en cas d'enrichissement CO_2 et causer un stress osmotique et l'inhibition spécifique de certaines enzymes.

La transition respiro-fermentaire est obtenue pour un taux de dilution critique plus faible dans l'accélérostat avec enrichissement CO_2 ce qui laisse suspecter un impact du CO_2 sur la transition respiro-fermentaire. La transition respiro-fermentaire en présence de CO_2 ne semble pas liée à une saturation de la capacité de la chaîne respiratoire dans la mesure où la valeur de la vitesse spécifique de consommation d'oxygène aux taux de dilution critique dans l'accélérostat avec enrichissement CO_2 est inférieure à celle observée dans l'accélérostat avec enrichissement CO_2 .

Une concentration élevée en dioxyde de carbone dissous peut entraîner une perte de l'adaptabilité cellulaire chez *S. cerevisiae*. Ce phénomène pourrait être lié aux dépenses d'énergie nécessaires pour résister au stress CO_2 . Une concentration élevée en dioxyde de carbone dissous cause une diminution du taux de dilution critique et semble donc

affecter la transition respiro-fermentaire. Les mécanismes à l'origine de cette transition métabolique anticipée n'ont pas pu être identifiés.

Ce travail a permis de mettre en évidence l'implication du CO_2 sur la flexibilité métabolique et le déclenchement de l'effet Crabtree chez *S. cerevisiae* ce qui n'était pas soupçonné dans la littérature. Elle est d'intérêt pour la maîtrise des procédés faisant appel à la levure *S. cerevisiae* en métabolisme oxydatif dans la mesure où des gradients locaux de concentration en CO_2 dissous dans les réacteurs industriels (Baez et al., 2011) pourraient affecter localement l'adaptabilité cellulaire et donc affecter la productivité de ces procédés.

Conclusion générale

Les travaux de recherche réalisés dans le cadre de ces travaux de doctorat contribuent à la compréhension de l'impact du dioxyde de carbone sur la levure *S. cerevisiae*. L'analyse intégrée des phénomènes physiques et des phénomènes biologiques a permis de mettre à jour des résultats originaux concernant la désorption du CO_2 des moûts de fermentation et l'impact de ce composé sur la physiologie et le métabolisme de la levure *S. cerevisiae*. Les éléments de réponse identifiés aux questions scientifiques dégagées sont représentés sur la Figure 42. Contrairement à ce qu'affirmait Hou et collaborateurs en 2010 il apparaît donc que le CO_2 n'est pas un produit bénin du métabolisme cellulaire (Hou et al., 2010) et que son impact doit être considéré. Ces résultats originaux ont fait l'objet de la rédaction de trois publications.

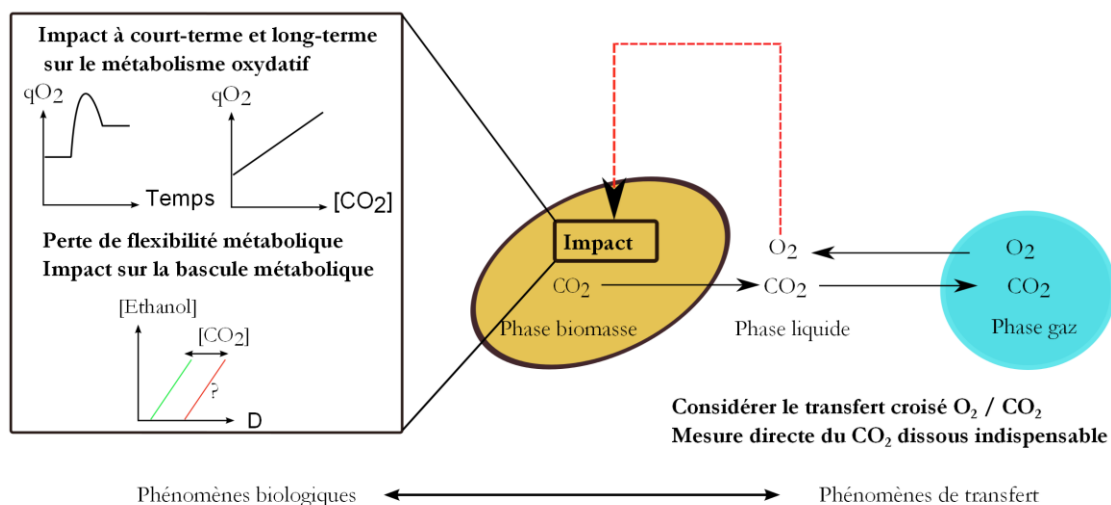


Figure 42. Eléments de réponse aux questions scientifiques.

Perspectives

Les travaux de recherches menés dans le cadre de ce projet de recherche ouvrent la voie à de nouvelles pistes d'investigation.

La mise en évidence de l'influence de la distribution de tailles de bulles en réacteur agité aéré sur les performances de transfert montre l'importance d'une caractérisation de cette distribution en conditions de culture microbienne. Les techniques optiques de mesure de taille de bulles ne peuvent être utilisées en raison de l'utilisation de fermenteurs inox sans viseur latéral ou de la densité importante des moûts (Bouaifi M. et al., 2001; Machon et al., 1997). Les mesures par sonde conductimétrique ne paraissent pas adaptées à la dynamique des conditions de culture (De Figueiredo, 1978). L'utilisation de techniques de type CSP (Capillary Suction Probe) (Alves et al., 2002; Barigou and Greaves, 1992; Laakkonen et al., 2005) apparaît possible à la condition de réaliser une sonde pouvant être utilisée en conditions stériles et pouvant prélever des bulles à différents endroits du réacteur afin d'étudier les distributions locales de bulles. Cette mesure apparaît indispensable pour apporter une validation des distributions de taille de bulles calculées dans ce travail par la mesure directe des tailles de bulles. L'utilisation de gaz traceur pour mesurer les distributions de temps de séjour de la phase gazeuse comme proposé par (Fyferling, 2007; Sieblist et al., 2011) est très dépendante des calculs de déconvolution du signal et ne permet pas une méthode directe des tailles de bulles. Une technique alternative consisterait à prélever un volume de moût avec quenching instantannée dans de l'azote liquide puis à analyser la composition des bulles piégées par tomographie.

La détermination des distributions de tailles de bulles en conditions de fermentation apparaît cruciale dans la mesure où l'une des tendances actuelles en ingénierie des réacteurs est le remplacement des turbines Rushton par des mobiles à flux axial de type hélice marine. Le déficit de puissance inhérent à l'utilisation de ces mobiles comparé à une turbine Rushton est compensé par une augmentation du diamètre du mobile (Nonus et al., 2008). Le mobile délivre alors la même puissance dissipée mais avec un débit de pompage plus élevé. Ce design de l'agitation a pour conséquence un temps de séjour plus élevé des bulles dans le moût et donc à une quantité d'oxygène transféré de la phase gaz à la phase liquide plus importante. La désorption du dioxyde de carbone serait en revanche sévèrement affectée comme démontré par le calcul dans ce travail.

L'impact du dioxyde de carbone sur le pH intracellulaire est souvent suggéré dans la littérature mais le suivi évolution dynamique du pH intracellulaire suite à un incrément de la concentration en CO₂ dissous n'a jamais été réalisé. La mesure du pH intracellulaire en conditions dynamiques est en effet un challenge scientifique en raison de la rapidité du transfert biomasse / liquide du

CO₂. L'une des techniques possibles est la mesure de la distribution instantanée d'un acide faible entre la phase liquide et la phase biomasse comme proposé pour l'acide benzoïque par (Kresnowati et al., 2007) et pour l'acide propionique par (Faure, 2005). Des essais de détermination du pH intracellulaire par ajout pulsé d'acide propionique ont été réalisées en culture continue régime permanent et permettent de calculer une valeur du pH intracellulaire à 6.85 ± 0.06 ce qui est en adéquation avec les valeurs rapportées dans la littérature pour la souche utilisée (Kresnowati et al., 2007). L'inconvénient majeur de cette technique est qu'elle ne permet qu'un point de mesure et qu'elle ne peut donc être utilisée pour un suivi dynamique de l'évolution du pH intracellulaire au cours d'un stress. Une alternative serait l'utilisation d'une souche modifiée génétiquement et exprimant la pHfluorine (Orij et al., 2009) permettant une mesure rapide et fiable de la valeur du pH intracellulaire. Il est possible d'imaginer une expérimentation où la mesure de la fluorescence de la sonde serait mesurée en continu par une cellule de mesure située dans une boucle de recirculation extérieure au réacteur. La valeur du pH intracellulaire ainsi obtenue serait alors représentative de la réalité dans la mesure où les cellules seraient maintenues dans les conditions maîtrisées du réacteur. Ainsi il serait possible d'obtenir l'évolution du pH intracellulaire à court-terme et à long-terme en réponse à différents stress CO₂.

Enfin, l'influence de concentrations élevées en dioxyde de carbone dissous sur la flexibilité cellulaire pourrait être étudiée en réalisant différents accélérostats à une concentration en CO₂ dissous donnée en utilisant différentes valeurs du taux d'accroissement du taux de dilution. Il serait ainsi possible d'évaluer la capacité de la levure à supporter différentes dynamiques de changement de son environnement. De plus, il serait intéressant d'isoler l'effet du CO₂ sur la flexibilité métabolique et la transition respiro-fermentaire en le dissociant des stress potentiellement induits par la présence d'acétate et de succinate lors de cultures enrichies en CO₂. L'utilisation de cultures continues et continues accélérées en substrats mixtes glucose – acetate et glucose – succinate, enrichies ou en CO₂, ne paraît pas pertinente car les substrats carbonés doivent être limitants et leurs concentrations résiduelles sont donc nulles. Des ajouts pulsés d'acétate ou de succinate à une culture continue sur glucose, enrichie ou non en CO₂, permettrait d'évaluer la part respective de ces composés (acetate, succinate, CO₂) dans la réponse cellulaire.

Références bibliographiques

- Abbott DA, Knijnenburg TA, de Poorter LMI, Reinders MJT, Pronk JT, van Maris AJA. 2007. Generic and specific transcriptional responses to different weak organic acids in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS yeast research* **7**:819–33.
- Abe F, Horikoshi K. 1998. Analysis of intracellular pH in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under elevated hydrostatic pressure: a study in baro- (piezo-) physiology. *Extremophiles* **2**:223–228.
- Aboka FO, van Winden WA, Reginald MM, van Gulik WM, van de Berg M, Oudshoorn A, Heijnen JJ. 2012. Identification of informative metabolic responses using a minibioreactor: a small step change in the glucose supply rate creates a large metabolic response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **29**:95–110.
- Agrimi G, Brambilla L, Frascotti G, Pisano I, Porro D, Vai M, Palmieri L. 2011. Deletion or overexpression of mitochondrial NAD⁺ carriers in *Saccharomyces cerevisiae* alters cellular NAD and ATP contents and affects mitochondrial metabolism and the rate of glycolysis. *Applied and environmental microbiology* **77**:2239–46.
- Aguilera J, Van Dijken JP, De Winde JH, Pronk JT. 2005a. Carbonic anhydrase (Nce103p): an essential biosynthetic enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* at atmospheric carbon dioxide pressure. *Biochemical Journal* **391**:311–6.
- Aguilera J, Petit T, Winde JH, Pronk JT, de Winde JH. 2005b. Physiological and genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to high carbon dioxide concentrations. *FEMS Yeast Research* **5**:579–93.
- Alexander MA, Jeffries TW. 1990. Respiratory efficiency and metabolite partitioning as regulatory phenomena in yeasts. *Enzyme and Microbial Technology* **12**:2–19.
- Alfenore S, Molina-Jouve C, Guillouet SE, Uribe Larrea J-L, Goma G, Benbadis L. 2002. Improving ethanol production and viability of *Saccharomyces cerevisiae* by a vitamin feeding strategy during fed-batch process. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**:67–72.
- Alves SS, Maia CI, Vasconcelos JMT. 2004. Gas-liquid mass transfer coefficient in stirred tanks interpreted through bubble contamination kinetics. *Chemical Engineering and Processing* **43**:823–830.
- Alves SS, Maia CI, Vasconcelos JMT, Serralheiro AJ. 2002. Bubble size in aerated stirred tanks. *Chemical Engineering Journal (Amsterdam, Netherlands)* **89**:109–117.
- Amoroso G, Morell-Avrahov L, Müller D, Klug K, Sültemeyer D. 2005. The gene NCE103 (YNL036w) from *Saccharomyces cerevisiae* encodes a functional carbonic anhydrase and its transcription is regulated by the concentration of inorganic carbon in the medium. *Molecular Microbiology* **56**:549–58.
- Baez A. 2009. Respuesta metabólica y transcripcional de *Escherichia coli* recombinante ante condiciones constantes y fluctuantes de CO₂ disuelto : un estudio de escalamiento descendente.; Universidad Nacional Autónoma de México UNAM.

- Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. 2009. Metabolic and transcriptional response of recombinant *Escherichia coli* to elevated dissolved carbon dioxide concentrations. *Biotechnology and Bioengineering* **104**:102–10.
- Baez A, Flores N, Bolívar F, Ramírez OT. 2011. Simulation of dissolved CO₂ gradients in a scale-down system: a metabolic and transcriptional study of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnology journal* **6**:959–67.
- Bahn Y-S, Mühlshlegel FA. 2006. CO₂ sensing in fungi and beyond. *Current opinion in microbiology* **9**:572–8.
- Barford JP, Hall RJ. 1979. An Examination of the Crabtree Effect in *Saccharomyces cerevisiae*: the Role of Respiratory Adaptation. *Journal of General Microbiology* **114**:267–275.
- Barigou M, Greaves M. 1992. Bubble-size distributions in a mechanically agitated gas—liquid contactor. *Chemical Engineering Science* **47**:2009–2025.
- Bauer J, Luttik MAH, Flores C-L, Dijken JP, Pronk J, Niederberger P. 1999. By-product formation during exposure of respiring *Saccharomyces cerevisiae* cultures to excess glucose is not caused by a limited capacity of pyruvate carboxylase. *FEMS Microbiology Letters* **179**:107–113.
- Bäumchen C, Knoll A, Husemann B, Seletzky J, Maier B, Dietrich C, Amoabediny G, Büchs J. 2007. Effect of elevated dissolved carbon dioxide concentrations on growth of *Corynebacterium glutamicum* on D-glucose and L-lactate. *Journal of Biotechnology* **128**:868–74.
- Beck C, Von Meyenburg HK. 1968. Enzyme Pattern and Aerobic Growth of *Saccharomyces cerevisiae* Under Various Degrees of Glucose Limitation. *J. Bacteriol.* **96**:479–486.
- Belo I, Pinheiro R, Mota M. 2003. Fed-batch cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* in a hyperbaric bioreactor. *Biotechnology Progress* **19**:665–71.
- Benson BB, Krause D, Peterson MA. 1979. The solubility and isotopic fractionation of gases in dilute aqueous solution. I. Oxygen. *Journal of Solution Chemistry* **8**:655–690.
- Van den Berg MA, de Jong-Gubbels P, Kortland CJ, van Dijken JP, Pronk JT, Steensma HY. 1996. The Two Acetyl-coenzyme A Synthetases of *Saccharomyces cerevisiae* Differ with Respect to Kinetic Properties and Transcriptional Regulation. *Journal of Biological Chemistry* **271**:28953–9.
- Bhavaraju SM, Russell TWF, Blanch HW. 1978. The design of gas sparged devices for viscous liquid systems. *AIChE Journal* **24**:454–466.
- Bideaux C. 2000. Modélisation stoechiométrique des productions microbiennes par descripteur métabolique au moyen du calcul formel. Validation sur le modèle *Kluyveromyces marxianus*; INSA Toulouse.
- Bloemen HHJ, Wu L, van Gulik WM, Heijnen JJ, Verhaegen MHG. 2003. Reconstruction of the O₂ uptake rate and CO₂ evolution rate on a time scale of seconds. *AIChE Journal* **49**:1895–1908.

- Blom J, De Mattos MJT, Grivell LA. 2000. Redirection of the Respiro-Fermentative Flux Distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by Overexpression of the Transcription Factor Hap4p. *Applied and Environmental Microbiology* **66**:1970–1973.
- Boles E, de Jong-Gubbels P, Pronk JT. 1998. Identification and Characterization of MAE1, the *Saccharomyces cerevisiae* Structural Gene Encoding Mitochondrial Malic Enzyme. *J. Bacteriol.* **180**:2875–2882.
- Bouaifi M., Hebrard G., Bastoul D., Roustan M. 2001. A comparative study of gas hold-up, bubble size, interfacial area and mass transfer coefficients in stirred gas-liquid reactors and bubble columns. *Chemical Engineering and Processing* **40**:15.
- Bouwman J, Eunen K van, Tuzun I, Postmus J, Canelas A, Brink J van der, Lindenberg PA, Mattos MJT De, Smits GJ, Brul S, Hellingwerf KJ, Westerhoff HV, Bakker BM. 2007. Standardization and “in vivo”-like enzyme activity measurements in yeast. *Experimental Standard Conditions of Enzyme Characterizations*:11–20.
- Branson JP, Nezic M, Jitrapakdee S, Wallace JC, Attwood P V. 2004. Kinetic characterization of yeast pyruvate carboxylase isozyme Pyc1 and the Pyc1 mutant, C249A. *Biochemistry* **43**:1075–81.
- Camarasa C. 2003. Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in *Saccharomyces cerevisiae* during anaerobic fermentation. *Microbiology* **149**:2669–2678.
- Campelo AF, Belo I. 2004. Fermentative capacity of baker's yeast exposed to hyperbaric stress. *Biotechnology Letters* **26**:1237–40.
- Canelas AB, ten Pierick A, Ras C, Seifar RM, van Dam JC, van Gulik WM, Heijnen JJ. 2009. Quantitative evaluation of intracellular metabolite extraction techniques for yeast metabolomics. *Analytical chemistry* **81**:7379–89.
- Canelas AB, Ras C, ten Pierick A, van Gulik WM, Heijnen JJ. 2011. An in vivo data-driven framework for classification and quantification of enzyme kinetics and determination of apparent thermodynamic data. *Metabolic engineering* **13**:294–306.
- Carlson M. 1999. Glucose repression in yeast. *Current Opinion in Microbiology* **2**:202–207.
- Castan A, Näsman A, Enfors S-O. 2002. Oxygen enriched air supply in *Escherichia coli* processes: production of biomass and recombinant human growth hormone. *Enzyme and Microbial Technology* **30**:847–854.
- Castelli A, Littarru GP, Barbaresi G. 1969. Effect of pH and CO₂ concentration changes on lipids and fatty acids of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archiv for Mikrobiologie* **66**:34–39.
- Cents AHG. 2003. Mass transfer and hydrodynamics in stirred gas - liquid - liquid contactors.; University of Twente.

- Cents AHG, de Bruijn FT, Brilman DWF, Versteeg GF. 2005. Validation of the Danckwerts-plot technique by simultaneous chemical absorption of and physical desorption of. *Chemical Engineering Science* **60**:5809–5818.
- Charpentier Jean-Claude, Christine R, Gabriel W. 1997. Absorption avec réaction chimique. *Techniques de l'ingénieur*. Laboratoire des sciences du Génie chimique CNRS-ENSIC, Professeur à l'École supérieure d'ingénieurs des techniques de l'industrie (Institut national polytechnique de Lorraine): Editions T.I.
- Chen SSL, Gutmanns F, Gutmanis F. 1976. Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnology and Bioengineering* **18**:1455–62.
- Chen SSL, Gutmanis F. 1976. Carbon dioxide inhibition of yeast growth in biomass production. *Biotechnology and Bioengineering* **18**:1455–62.
- Clark D, Rowlett RS, Coleman JR, Klessig DF. 2004. Complementation of the yeast deletion mutant DeltaNCE103 by members of the beta class of carbonic anhydrases is dependent on carbonic anhydrase activity rather than on antioxidant activity. *Biochemical Journal* **379**:609–15.
- Cleves AE. 1996. A new pathway for protein export in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Cell Biology* **133**:1017–1026.
- Confederation of European Yeast Producers. 2013. Confederation of European Yeast Producers. www.cofalec.com.
- Cortassa S, Aon M. 1998. The onset of fermentative metabolism in continuous cultures depends on the catabolite repression properties of *saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **22**:705–712.
- Crabtree HG. 1929. Observations on the carbohydrate metabolism of tumours. *The Biochemical journal* **23**:536–45.
- Cronk JD, Endrizzi JA, Cronk MR, O'neill JW, Zhang KY. 2001. Crystal structure of *E. coli* beta-carbonic anhydrase, an enzyme with an unusual pH-dependent activity. *Protein science : a publication of the Protein Society* **10**:911–22.
- Cui YQ, van der Lans RGJM, Luyben KCAM. 1996. Local power uptake in gas-liquid systems with single and multiple rushton turbines. *Chemical Engineering Science* **51**:2631–2636.
- Dahod SK. 1993. Dissolved carbon dioxide measurement and its correlation with operating parameters in fermentation processes. *Biotechnology Progress* **9**:655–60.
- Daran-Lapujade P, Daran J-M, van Maris AJA, de Winde JH, Pronk JT. 2009. Chemostat-based micro-array analysis in baker's yeast. *Advances in microbial physiology* **54**:257–311.
- De Deken RH. 1966. The Crabtree effect: a regulatory system in yeast. *Journal of general microbiology* **44**:149–56.

- DeRisi JL. 1997. Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science* **278**:680–686.
- Devatine A, Chiciuc I, Poupot C, Mietton-Peuchot M. 2007. Micro-oxygenation of wine in presence of dissolved carbon dioxide. *Chemical Engineering Science* **62**:4579–4588.
- Dickson AG, Millero FJ. 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep-Sea Research, Part A: Oceanographic Research Papers* **34**:1733–1743.
- Van Dijken J., Bauer J, Brambilla L, Duboc P, Francois J., Gancedo C, Giuseppin ML., Heijnen JJ, Hoare M, Lange H., Madden E., Niederberger P, Nielsen J, Parrou J., Petit T, Porro D, Reuss M, van Riel N, Rizzi M, Steensma H., Verrips C., Vindeløv J, Pronk JT. 2000. An interlaboratory comparison of physiological and genetic properties of four *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Enzyme and Microbial Technology* **26**:706–714.
- Dixon NM, Kell DB. 1989. The inhibition by CO₂ of the growth and metabolism of micro-organisms. *Journal of Applied Microbiology* **67**:109–136.
- Eigen M, Kustin K, Maass G. 1961. Die Geschwindigkeit der Hydratation von SO₂ in wässriger Lösung. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* **30**:130–136.
- Elleuche S, Pöggeler S. 2010. Carbonic anhydrases in fungi. *Microbiology (Reading, England)* **156**:23–9.
- El-Sabbagh N, Harvey LM, McNeil B. 2008. Effects of dissolved carbon dioxide on growth, nutrient consumption, cephalosporin C synthesis and morphology of *Acremonium chrysogenum* in batch cultures. *Enzyme and Microbial Technology* **42**:315–324.
- El-Sabbagh N, McNeil B, Harvey LM. 2006. Dissolved carbon dioxide effects on growth, nutrient consumption, penicillin synthesis and morphology in batch cultures of *Penicillium chrysogenum*. *Enzyme and Microbial Technology* **39**:185–190.
- Van Eunen K, Bouwman J, Daran-Lapujade P, Postmus J, Canelas AB, Mensonides FIC, Orij R, Tuzun I, van den Brink J, Smits GJ, van Gulik WM, Brul S, Heijnen JJ, de Winde JH, de Mattos MJT, Kettner C, Nielsen J, Westerhoff H V, Bakker BM. 2010. Measuring enzyme activities under standardized in vivo-like conditions for systems biology. *The FEBS journal* **277**:749–60.
- Faure L. 2005. Homéostasie cellulaire chez *Saccharomyces cerevisiae* : étude des effets des acides faibles.; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Feldman O, Mayinger E. 1999. Bubble size distribution in an aerated stirred reactor; Technische Universität München.
- Feldman O, Mayinger E. 2004. Bubble dispersion in aerated stirred vessels. Ed. Martin Sommerfeld. *Heat and Mass Transfer*. Heat and Mass Transfer:319–335.
- Féria-Gervasio D. 2008. Analyse systémique de la modulation de la transition respiro-fermentaire par l'acide oléique chez *Saccharomyces cerevisiae*; INSA Toulouse.

- Feria-Gervasio D, Mouret J-R, Gorret N, Goma G, Guillouet SE. 2008. Oleic acid delays and modulates the transition from respiratory to fermentative metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* after exposure to glucose excess. *Applied microbiology and biotechnology* **78**:319–31.
- Fiechter A, Fuhrmann GF, Käppeli O. 1981. Regulation of Glucose Metabolism in Growing Yeast Cells. *Advances in Microbial Physiology* **22**:123–183.
- De Figueiredo MML. 1978. The physical and mass transfer properties of gases dispersions in mixing vessels. *phD Thesis*.
- Flikweert MT, Van Der Zanden L, Janssen WM, Steensma HY, Van Dijken JP, Pronk JT. 1996. Pyruvate decarboxylase: an indispensable enzyme for growth of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose. *Yeast (Chichester, England)* **12**:247–57.
- Flikweert MT, Swaaf M, Dijken JP, Pronk JT. 1999. Growth requirements of pyruvate-decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **174**:73–79.
- Flikweert M, van Dijken J, Pronk J. 1997. Metabolic responses of pyruvate decarboxylase-negative *Saccharomyces cerevisiae* to glucose excess. *Appl. Envir. Microbiol.* **63**:3399–3404.
- Forsburg SL, Guarente L. 1989. Identification and characterization of HAP4: a third component of the CCAAT-bound HAP2/HAP3 heteromer. *Genes & Development* **3**:1166–1178.
- Frahm B, Blank H-C, Cornand P, Oelßner W, Guth U, Lane P, Munack A, Johannsen K, Pörtner R. 2002. Determination of dissolved CO₂ concentration and CO₂ production rate of mammalian cell suspension culture based on off-gas measurement. *Journal of Biotechnology* **99**:133–148.
- Franzén CJ. 2003. Metabolic flux analysis of RQ-controlled microaerobic ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **20**:117–32.
- Frick O, Wittmann C. 2005. Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microbial cell factories* **4**:30.
- Fujasová M, Linek V, Moucha T. 2007. Mass transfer correlations for multiple-impeller gas–liquid contactors. Analysis of the effect of axial dispersion in gas and liquid phases on “local” values measured by the dynamic pressure method in individual stages of the vessel. *Chemical Engineering Science* **62**:1650–1669.
- Fyferling M. 2007. Transfert d’oxygène en conditions de culture microbienne intensive; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.
- Fyferling M, Uribe Larrea J-L, Goma G, Molina-Jouve C. 2008. Oxygen transfer in intensive microbial culture. *Bioprocess and Biosystems Engineering* **31**:595–604.
- Gabelle J-C. 2012. Analyse locale et globale de l’hydrodynamique et du transfert de matière dans des fluides à rhéologie complexe caractéristiques des milieux de fermentation.; Institut National des Sciences Appliquées de Toulouse.

- Galaction A-I, Cascaval D, Oniscu C, Turnea M. 2004. Prediction of oxygen mass transfer coefficients in stirred bioreactors for bacteria, yeasts and fungus broths. *Biochemical Engineering Journal* **20**:85–94.
- Gancedo JM. 1992. Carbon catabolite repression in yeast. *European Journal of Biochemistry* **206**:297–313.
- Gancedo JM. 1998. Yeast Carbon Catabolite Repression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **62**:334–361.
- Garcia-Gonzalez L, Geeraerd AH, Spilimbergo S, Elst K, Van Ginneken L, Debevere J, Van Impe JF, Devlieghere F. 2007. High pressure carbon dioxide inactivation of microorganisms in foods: the past, the present and the future. *International journal of food microbiology* **117**:1–28.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E. 2009. Bioreactor scale-up and oxygen transfer rate in microbial processes: an overview. *Biotechnology Advances* **27**:153–76.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E. 2004. Theoretical prediction of gas–liquid mass transfer coefficient, specific area and hold-up in sparged stirred tanks. *Chemical Engineering Science* **59**:2489–2501.
- Garcia-Ochoa F, Gomez E, Santos VE, Merchuk JC. 2010. Oxygen uptake rate in microbial processes: An overview. *Biochemical Engineering Journal* **49**:289–307.
- Genomes KKE of G and. KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. <http://www.genome.jp/kegg/>.
- Gibbons BH, Edsall JT. 1963. Rate of hydration of carbon dioxide and dehydration of carbonic acid at 25 degrees. *Journal of biological chemistry* **238**:3502–3507.
- Giulitti S, Cinquemani C, Spilimbergo S. 2011. High pressure gases: role of dynamic intracellular pH in pasteurization. *Biotechnology and bioengineering* **108**:1211–4.
- Goffeau A, Barrell BG, Bussey H, Davis RW, Dujon B, Feldmann H, Galibert F, Hoheisel JD, Jacq C, Johnston M, Louis EJ, Mewes HW, Murakami Y, Philippsen P, Tettelin H, Oliver SG. 1996. Life with 6000 Genes. *Science* **274**:546–567.
- Gogate PR, Beenackers AAC., Pandit AB. 2000. Multiple-impeller systems with a special emphasis on bioreactors: a critical review. *Biochemical Engineering Journal* **6**:109–144.
- Goldberg RN, Tewari YB, Bhat TN. 2004. Thermodynamics of enzyme-catalyzed reactions--a database for quantitative biochemistry. *Bioinformatics (Oxford, England)* **20**:2874–7.
- Gombert AK, Moreira dos Santos M, Christensen B, Nielsen J. 2001. Network identification and flux quantification in the central metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* under different conditions of glucose repression. *Journal of bacteriology* **183**:1441–51.
- Gonzalez-Meler MA, Ribas-Carbo M, Siedow JN, Drake BG. 1996. Direct Inhibition of Plant Mitochondrial Respiration by Elevated CO₂. *Plant Physiology* **112**:1349–1355.

- Götz R, Gnann A, Zimmermann FK. 1999. Deletion of the carbonic anhydrase-like gene NCE103 of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* causes an oxygen-sensitive growth defect. *Yeast* **15**:855–64.
- Grau R., Heiskanen K. 2002. Visual technique for measuring bubble size in flotation machines. *Minerals Engineering* **15**:507–513.
- Gray DR, Chen S, Howarth W, Inlow D, Maiorella BL. 1996. CO₂ in large-scale and high-density CHO cell perfusion culture. *Cytotechnology* **22**:65–78.
- Green DW, Perry RH. Perry's Chemical Engineer's Handbook. McGraw-Hill Professional.
- Guan Q, Haroon S, Bravo DG, Will JL, Gasch AP. 2012. Cellular memory of acquired stress resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **192**:495–505.
- Guillou V. 1996. Etude du comportement dynamique de *Saccharomyces cerevisiae* en culture continue dans la région oxydative des taux de croissance; INSA Toulouse.
- Gutknecht J, Bisson MA, Tosteson FC. 1977. Diffusion of carbon dioxide through lipid bilayer membranes: effects of carbonic anhydrase, bicarbonate, and unstirred layers. *The Journal of general physiology* **69**:779–94.
- Hansson I. 1973. A new set of acidity constants for carbonic acid and boric acid in sea water. *Deep Sea Research and Oceanographic Abstracts* **20**:461–478.
- Van der Heijden RT, Heijnen JJ, Hellinga C, Romein B, Luyben KC. 1994. Linear constraint relations in biochemical reaction systems: I. Classification of the calculability and the balanceability of conversion rates. *Biotechnology and Bioengineering* **43**:11–20.
- Herwig C, von Stockar U. 2002. Quantitative analysis of the oxidative metabolism in HXK2- and REG1-deletion mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme and Microbial Technology* **31**:698–710.
- Heux S, Cachon R, Dequin S. 2006. Cofactor engineering in *Saccharomyces cerevisiae*: Expression of a H₂O-forming NADH oxidase and impact on redox metabolism. *Metabolic Engineering* **8**:303–314.
- Hill GA. 2006. Measurement of Overall Volumetric Mass Transfer Coefficients for Carbon Dioxide in a Well-Mixed Reactor Using a pH Probe. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **45**:5796–5800.
- Hiltbrunner K, Zizek C. 2006. Current Topics on Bioprocesses in Food Industry. In: Christian Larroche, AP and C-GD, editor. Asiatech Pub.
- Hinze JO. 1955. Fundamentals of the hydrodynamic mechanism of splitting in dispersion processes. *AIChE Journal* **1**:289–295.
- Ho CS, Smith MD. 1986. Effect of dissolved carbon dioxide on penicillin fermentations: Mycelial growth and penicillin production. *Biotechnology and Bioengineering* **28**:668–77.

- Van Hoek P, Flikweert MT, van der Aart QJM, Steensma HY, van Dijken JP, Pronk JT. 1998. Effects of Pyruvate Decarboxylase Overproduction on Flux Distribution at the Pyruvate Branch Point in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Envir. Microbiol.* **64**:2133–2140.
- Den Hollander JA, Ugurbil K, Brown TR, Shulman RG. 1981. Phosphorus-31 nuclear magnetic resonance studies of the effect of oxygen upon glycolysis in yeast. *Biochemistry* **20**:5871–5880.
- Holyoak CD, Bracey D, Piper PW, Kuchler K, Coote PJ. 1999. The *Saccharomyces cerevisiae* Weak-Acid-Inducible ABC Transporter Pdr12 Transports Fluorescein and Preservative Anions from the Cytosol by an Energy-Dependent Mechanism. *J. Bacteriol.* **181**:4644–4652.
- Holyoak C, Stratford M, McMullin Z, Cole M, Crimmins K, Brown A, Coote P. 1996. Activity of the plasma membrane H(+)-ATPase and optimal glycolytic flux are required for rapid adaptation and growth of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of the weak-acid preservative sorbic acid. *Appl. Envir. Microbiol.* **62**:3158–3164.
- Hou J, Lages NF, Oldiges M, Vemuri GN. 2009. Metabolic impact of redox cofactor perturbations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metabolic engineering* **11**:253–61.
- Hou J, Scalcinati G, Oldiges M, Vemuri GN. 2010. Metabolic impact of increased NADH availability in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **76**:851–9.
- Huberts DHEW, Niebel B, Heinemann M. 2012. A flux-sensing mechanism could regulate the switch between respiration and fermentation. *FEMS yeast research* **12**:118–28.
- Hudcova V, Machon V, Nienow AW. 1989. Gas-liquid dispersion with dual Rushton turbine impellers. *Biotechnology and Bioengineering* **34**:617–28.
- Hughmark GA. 1980. Power Requirements and Interfacial Area in Gas-Liquid Turbine Agitated Systems. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **19**:638–641.
- Innocenti A, Mühlischlegel FA, Hall RA, Steegborn C, Scozzafava A, Supuran CT. 2008. Carbonic anhydrase inhibitors: inhibition of the beta-class enzymes from the fungal pathogens *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans* with simple anions. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* **18**:5066–70.
- Isenschmid A. 1995. The influence of pressure and temperature of compressed CO₂ on the survival of yeast cells. *Journal of Biotechnology* **39**:229–237.
- Jockwer A, Klinger C, Gätgens J, Eisenkrätzer D, Noll T. 2007. Towards pCO₂-optimized Fermentations - Reliable Sampling, pCO₂ control and Cellular Metabolism. In: Smith, R, editor. *Cell Technology for Cell Products*. Dordrecht: Springer Netherlands, pp. 509–518.
- Johnson KS. 1982. Carbon dioxide hydration and dehydration kinetics in seawater. *Limnology and Oceanography* **27**.
- Jones RP, Greenfield PF. 1982. Effect of carbon dioxide on yeast growth and fermentation. *Enzyme and Microbial Technology* **4**:210–223.

- Jones S, Evans G, Galvin K. 1999. Bubble nucleation from gas cavities — a review. *Advances in Colloid and Interface Science* **80**:27–50.
- De Jonge LP, Heijnen JJ, van Gulik WM. 2014. Reconstruction of the oxygen uptake and carbon dioxide evolution rates of microbial cultures at near-neutral pH during highly dynamic conditions. *Biochemical Engineering Journal* **83**:42–54.
- De Jong-Gubbels P, Berg MA, Luttik MA., Steensma HY, Dijken JP, Pronk JT. 1998. Overproduction of acetyl-coenzyme A synthetase isoenzymes in respiring *Saccharomyces cerevisiae* cells does not reduce acetate production after exposure to glucose excess. *FEMS Microbiology Letters* **165**:15–20.
- Jouhten P, Rintala E, Huuskonen A, Tamminen A, Toivari M, Wiebe M, Ruohonen L, Penttilä M, Maaheimo H. 2008. Oxygen dependence of metabolic fluxes and energy generation of *Saccharomyces cerevisiae* CEN.PK113-1A. *BMC systems biology* **2**:60.
- Ju LK, Ho CS, Shanahan JF. 1991. Effects of Carbon dioxide on the Rheological behavior and oxygen transfer in submerged penicillin fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* **38**:1223–32.
- Junker BH. 2004. Scale-up methodologies for *Escherichia coli* and yeast fermentation processes. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **97**:347–364.
- Karl DW, Roth KM, Schendel FJ, Gooch VD, Jordan BJ. 1997. Carbon dioxide effects on fuel alcohol fermentation. In: Saha, BC, Woodward, J, editors. *Fuel and chemicals from biomass*. Washington, DC: American Chemical Society. ACS Symposium Series, Vol. 666, pp. 93–109.
- Kasemets K, Drews M, Nisamedtinov I, Adamberg K, Paalme T. 2003. Modification of A-stat for the characterization of microorganisms. *Journal of Microbiological Methods* **55**:187–200.
- Keulers M. 1996. Autonomous metabolic oscillation in continuous culture of *Saccharomyces cerevisiae* grown on ethanol. *FEMS Microbiology Letters* **142**:253–258.
- Keulers M, Satroutdinov AD, Suzuki T, Kuriyama H. 1996. Synchronization affector of autonomous short-period-sustained oscillation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **12**:673–82.
- Klein CJ, Olsson L, Nielsen J. 1998. Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology (Reading, England)* **144** (Pt 1):13–24.
- Klein CL, Rasmussen J, Rønnow B, Olsson L, Nielsen J. 1999. Investigation of the impact of MIG1 and MIG2 on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biotechnology* **68**:197–212.
- Knatchbull FB, Slaughter JC. 1987. The effect of low CO₂ pressures on the absorption of amino acids and production of flavour-active volatiles by yeast. *Journal of the Institute of Brewing* **93**:420–424.

- Knoll A, Bartsch S, Husemann B, Engel P, Schroer K, Ribeiro B, Stöckmann C, Seletzky J, Büchs J. 2007. High cell density cultivation of recombinant yeasts and bacteria under non-pressurized and pressurized conditions in stirred tank bioreactors. *Journal of biotechnology* **132**:167–79.
- Ko CH, Gaber RF. 1991. TRK1 and TRK2 encode structurally related K⁺ transporters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **11**:4266–4273.
- Kordač M, Linek V. 2008. Dynamic Measurement of Carbon Dioxide Volumetric Mass Transfer Coefficient in a Well-Mixed Reactor Using a pH Probe: Analysis of the Salt and Supersaturation Effects. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **47**:1310–1317.
- Kresnowati MTAP, Suarez-Mendez C, Groothuizen MK, van Winden WA, Heijnen JJ. 2007. Measurement of fast dynamic intracellular pH in *Saccharomyces cerevisiae* using benzoic acid pulse. *Biotechnology and Bioengineering* **97**:86–98.
- Kresnowati MTAP, Suarez-Mendez CM, van Winden WA, van Gulik WM, Heijnen JJ. 2008a. Quantitative physiological study of the fast dynamics in the intracellular pH of *Saccharomyces cerevisiae* in response to glucose and ethanol pulses. *Metabolic Engineering* **10**:39–54.
- Kresnowati MTAP, van Winden WA, van Gulik WM, Heijnen JJ. 2008b. Dynamic in vivo metabolome response of *Saccharomyces cerevisiae* to a stepwise perturbation of the ATP requirement for benzoate export. *Biotechnology and Bioengineering* **99**:421–41.
- Kresnowati MTAP, van Winden WA, van Gulik WM, Heijnen JJ. 2008c. Energetic and metabolic transient response of *Saccharomyces cerevisiae* to benzoic acid. *FEBS Journal* **275**:5527–41.
- Krishna R, Wesselingh JA. 1997. The Maxwell-Stefan approach to mass transfer. *Chemical Engineering Science* **52**:861–911.
- Krook D, Mashego M., Van Gulik W., Heijnen JJ. 2004. Effect of Dissolved Carbon Dioxide Concentration on the Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*; Technical University of Delft.
- Kuriyama H, Mahakarnchanakul W, Matsui S, Kobayashi H. 1993. The effects of pCO₂ on yeast growth and metabolism under continuous fermentation. *Biotechnology Letters* **15**:189–194.
- Laakkonen M, Moilanen P, Miettinen T, Saari K, Honkanen M, Saarenrinne P, Aittamaa J. 2005. Local Bubble Size Distributions in Agitated Vessel. *Chemical Engineering Research and Design* **83**:50–58.
- Laakkonen M, Moilanen P, Alopaeus V, Aittamaa J. 2007. Modelling local bubble size distributions in agitated vessels. *Chemical Engineering Science* **62**:721–740.
- Labík L, Vostal R, Moucha T, Rejl F, Kordač M. 2014. Volumetric mass transfer coefficient in multiple-impeller gas–liquid contactors. Scaling-up study for various impeller types. *Chemical Engineering Journal* **240**:55–61.

- Lamont JC, Scott DS. 1970. An eddy cell model of mass transfer into the surface of a turbulent liquid. *AIChE Journal* **16**:513–519.
- Lange HC, Heijnen JJ. 2001. Statistical reconciliation of the elemental and molecular biomass composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering* **75**:334–44.
- Lascaris R. 2004. Overexpression of HAP4 in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of glucose-regulated genes. *Microbiology* **150**:929–934.
- Lascaris R, Bussemaker H, Boorsma A, Piper M, van der Spek H, Grivell L, Blom J. 2002. Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biology* **4**:R3.
- Lessard RR, Zieminski SA. 1971. Bubble coalescence and gas transfer in aqueous electrolytic solutions. *Industrial and Engineering Chemistry Fundamentals* **10**:260–269.
- Liljas A, Laurberg M. 2000. A wheel invented three times. The molecular structures of the three carbonic anhydrases. *EMBO reports* **1**:16–7.
- Lindskog S. 1997. Structure and mechanism of carbonic anhydrase. *Pharmacology & Therapeutics* **74**:1–20.
- Linek V, Moucha T, Dousova M, Sinkule J. 1994. Measurement of $k(L)a$ by dynamic pressure method in pilot-plant fermentor. *Biotechnology and bioengineering* **43**:477–82.
- Linek V, Kordač M, Moucha T. 2005. Mechanism of mass transfer from bubbles in dispersions. *Chemical Engineering and Processing* **44**:121–130.
- Linek V, Kordač M, Soni M. 2008. Mechanism of gas absorption enhancement in presence of fine solid particles in mechanically agitated gas–liquid dispersion. Effect of molecular diffusivity. *Chemical Engineering Science* **63**:5120–5128.
- Linek V, Moucha T, Sinkule J. 1996. Gas-liquid mass transfer in vessels stirred with multiple impellers—II. Modelling of gas-liquid mass transfer. *Chemical Engineering Science* **51**:3875–3879.
- Lodeyro AF, Calcaterra NB, Roveri OA. 2001. Inhibition of steady-state mitochondrial ATP synthesis by bicarbonate, an activating anion of ATP hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1506**:236–243.
- López R, Enríquez E, Peña A. 1999. Effects of weak acids on cation accumulation, delta pH and delta psi in yeast. *Yeast (Chichester, England)* **15**:553–62.
- Lueker TJ, Dickson AG, Keeling CD. 1999. Ocean pCO₂ calculated from dissolved inorganic carbon, alkalinity, and equations for K₁ and K₂ : validation based on laboratory measurements of CO₂ in gas and seawater at equilibrium. *Marine chemistry* **70**:105–119.
- Machon V, Pacek AW, Nienow AW. 1997. Bubble Sizes in Electrolyte and Alcohol Solutions in a Turbulent Stirred Vessel. *Chemical Engineering Research and Design* **75**:339–348.

- Macpherson N, Shabala L, Rooney H, Jarman MG, Davies JM. 2005. Plasma membrane H⁺ and K⁺ transporters are involved in the weak-acid preservative response of disparate food spoilage yeasts. *Microbiology (Reading, England)* **151**:1995–2003.
- Manon Y. 2012. Etude de milieux de culture complexes et évolutifs par développement de mesures physiques en ligne.; INSA Toulouse.
- Manon Y, Anne-Archard D, Uribelarrea J-L, Molina-Jouve C, Fillaudeau L. 2011. Physical and biological study of cell cultures in a bioreactor: on-line and off-line rheological analyses. *Applied Rheology*.
- Marc J, Feria-Gervasio D, Mouret J-R, Guillouet SE. 2013. Impact of oleic acid as co-substrate of glucose on “short” and “long-term” Crabtree effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial cell factories* **12**:83.
- Maresová L, Hosková B, Urbánková E, Chaloupka R, Sychrová H. 2010. New applications of pHluorin--measuring intracellular pH of prototrophic yeasts and determining changes in the buffering capacity of strains with affected potassium homeostasis. *Yeast (Chichester, England)* **27**:317–25.
- Van Maris AJA, Bakker BM, Brandt M, Boorsma A, Teixeira de Mattos MJ, Grivell LA, Pronk JT, Blom J. 2001. Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of HAP4 in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research* **1**:139–149.
- Marrero TR, Mason EA. 1972. Gaseous Diffusion Coefficients. *Journal of Physical and Chemical Reference Data* **1**:3.
- Mashego MR. 2005a. Robust experimental methods to study in-vivo pre-steady state kinetics of primary metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*; Technical University of Delft.
- Mashego MR. 2005b. Transient response of metabolome/fluxome of aerobic chemostat cultivated *Saccharomyces cerevisiae* to increased CO₂ concentration.
- Matsunaga N, Kano K, Maki Y, Dobashi T. 2009a. Culture scale-up studies as seen from the viewpoint of oxygen supply and dissolved carbon dioxide stripping. *Journal of bioscience and bioengineering* **107**:412–8.
- Matsunaga N, Kano K, Maki Y, Dobashi T. 2009b. Estimation of dissolved carbon dioxide stripping in a large bioreactor using model medium. *Journal of bioscience and bioengineering* **107**:419–24.
- McIntyre M, McNeil B. 1997a. Dissolved carbon dioxide effects on morphology, growth, and citrate production in *Aspergillus niger* A60. *Enzyme and Microbial Technology* **20**:135–142.
- McIntyre M, McNeil B. 1997b. Effect of carbon dioxide on morphology and product synthesis in chemostat cultures of *Aspergillus niger* A60. *Enzyme and Microbial Technology* **21**:479–483.
- McIntyre M, McNeil B. 1997c. Effects of elevated dissolved CO₂ levels on batch and continuous cultures of *Aspergillus niger* A60: an evaluation of experimental methods. *Applied and Environmental Microbiology* **63**:4171–4177.

- McIntyre M, McNeil B. 1998. Morphogenetic and biochemical effects of dissolved carbon dioxide on filamentous fungi in submerged cultivation. *Applied Microbiology and Biotechnology* **50**:291–298.
- Mehrbach C. 1973. Measurement of the apparent dissociation constants of carbonic acid in seawater at atmospheric pressure.
- Meijer MM, Boonstra J, Verkleij AJ, Verrips CT. 1998. Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae* is related to the glucose concentration rather than the glucose flux. *The Journal of biological chemistry* **273**:24102–7.
- Merchuck J. 1977. Further consideration on the enhancement factor for oxygen absorption into fermentation broth. *Biotechnology and Bioengineering* **XIX**:1885–1889.
- Von Meyenburg K. 1969. Energetics of the budding cycle of *Saccharomyces cerevisiae* during glucose limited aerobic growth. *Archiv für Mikrobiologie* **66**:289–303.
- Michel BJ, Miller SA. 1962. Power requirements of gas-liquid agitated systems. *AIChE Journal* **8**:262–266.
- Moreira dos Santos M, Raghevendran V, Kötter P, Olsson L, Nielsen J. 2004. Manipulation of malic enzyme in *Saccharomyces cerevisiae* for increasing NADPH production capacity aerobically in different cellular compartments. *Metabolic engineering* **6**:352–63.
- Moreira dos Santos M, Thygesen G, Kötter P, Olsson L, Nielsen J. 2003. Aerobic physiology of redox-engineered *Saccharomyces cerevisiae* strains modified in the ammonium assimilation for increased NADPH availability. *FEMS Yeast Research* **4**:59–68.
- Moroney J V., Bartlett SG, Samuelsson G. 2001. Carbonic anhydrases in plants and algae. *Plant, Cell and Environment* **24**:141–153.
- Moucha T, Linek V, Erokhin K, Rejl JF, Fijasová M. 2009. Improved power and mass transfer correlations for design and scale-up of multi-impeller gas-liquid contactors. *Chemical Engineering Science* **64**:598–604.
- Moucha T, Rejl FJ, Kordač M, Labík L. 2012. Mass transfer characteristics of multiple-impeller fermenters for their design and scale-up. *Biochemical Engineering Journal* **69**:17–27.
- Moucha T, Linek V, Prokopová E. 2003. Gas hold-up, mixing time and gas-liquid volumetric mass transfer coefficient of various multiple-impeller configurations: Rushton turbine, pitched blade and techmix impeller and their combinations. *Chemical Engineering Science* **58**:1839–1846. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009250902006826>.
- Mouret J-R. 2006. Modulation de la transition respiro-fermentaire chez *Saccharomyces cerevisiae* par l'oléate : analyse cinétique et métabolique en culture continue sur substrats mixtes; Institut National des Sciences Appliquées, Toulouse.
- Nagahisa K, Nakajima T, Yoshikawa K, Hirasawa T, Katakura Y, Furusawa C, Shioya S, Shimizu H. 2005. DNA microarray analysis on *Saccharomyces cerevisiae* under high carbon dioxide concentration in fermentation process. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **10**:451–461.

- Nipkow A, Sonnleitner B, Fiechter A. 1985. Effect of carbon dioxide on growth of *Zymomonas mobilis* in continuous culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* **21**.
- Nissen TL, Schulze U, Nielsen J, Villadsen J. 1997. Flux Distributions in Anaerobic, Glucose-Limited Continuous Cultures of *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology* **143**:203–218.
- Nocentini M, Fajner D, Pasquali G, Magelli F. 1993. Gas-liquid mass transfer and holdup in vessels stirred with multiple Rushton turbines: water and water-glycerol solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research* **32**:19–26.
- Nonus M, Cognart P, Kergoat F, Lebeault J-M. 2008. Fermenteurs industriels - Conception et réalisation. *Techniques de l'ingénieur*.
- Norton JS, Krauss RW. 1972. The inhibition of cell division in *Saccharomyces cerevisiae* (Meyen) by carbon dioxide. *Plant & Cell Physiology* **13**:139–149.
- Olz R, Larsson K, Adler L, Gustafsson L. 1993. Energy flux and osmoregulation of *Saccharomyces cerevisiae* grown in chemostats under NaCl stress. *J. Bacteriol.* **175**:2205–2213.
- Onken U, Liefke E. 1989. Effect of total and partial pressure (oxygen and carbon dioxide) on aerobic microbial processes. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* **40**:137–69.
- Orij PJ. 2010. On the intracellular pH of baker's yeast; University of Amsterdam.
- Orij R, Brul S, Smits GJ. 2011. Intracellular pH is a tightly controlled signal in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **1810**:933–944.
- Orij R, Postmus J, Ter Beek A, Brul S, Smits GJ. 2009. In vivo measurement of cytosolic and mitochondrial pH using a pH-sensitive GFP derivative in *Saccharomyces cerevisiae* reveals a relation between intracellular pH and growth. *Microbiology (Reading, England)* **155**:268–78.
- Orij R, Urbanus ML, Vizeacoumar FJ, Giaever G, Boone C, Nislow C, Brul S, Smits GJ. 2012. Genome-wide analysis of intracellular pH reveals quantitative control of cell division rate by pH(c) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome biology* **13**:R80.
- Ortloff H. 1900. Der Einfluß der Kohlensäure auf die Gärung. *Centralbl Bakteriöl Parasitenkunde Infektionskrankheiten*.
- Otero Romero JM. 2009. Industrial Systems Biology and Metabolic Engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. A case study in succinic acid production; Chalmers University, Göteborg.
- Overkamp KM, Bakker BM, Kotter P, van Tuijl A, de Vries S, van Dijken JP, Pronk JT. 2000. In Vivo Analysis of the Mechanisms for Oxidation of Cytosolic NADH by *Saccharomyces cerevisiae* Mitochondria. *Journal of Bacteriology* **182**:2823–2830.
- Paalme T, Vilu R. 1992. A new method of continuous cultivation with computer-controlled change of dilution rate. In: . *IFAC Symposia serie*. Press Pergamon, pp. 299–299.

- Paalme T, Elken R, Vilu R, Korhola M. 1997. Growth efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* on glucose/ethanol media with a smooth change in the dilution rate (A-stat). *Enzyme and Microbial Technology* **20**:174–181.
- Paalme T, Kahru A, Elken R, Vanatalu K, Tiisma K, Raivo V. 1995. The computer-controlled continuous culture of *Escherichia coli* with smooth change of dilution rate (A-stat). *Journal of Microbiological Methods* **24**:145–153.
- Pagliardini J. 2010. Optimisation du rendement de production de bioéthanol chez *Saccharomyces cerevisiae* par minimisation de la synthèse du glycérol : approche intégrée de génie métabolique et microbiologique; INSA Toulouse.
- Pagliardini J, Hubmann G, Bideaux C, Alfenore S, Nevoigt E, Guillouet SE. 2010. Quantitative evaluation of yeast's requirement for glycerol formation in very high ethanol performance fed-batch process. *Microbial cell factories* **9**:36.
- Painmanakul P. 2005. Analyse locale du transfert de matière associé à la formation de bulles générées par différents types d'orifices dans différentes phases liquides Newtoniennes : étude expérimentale et modélisation.
- Parrou JL, François J. 1997. A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Analytical biochemistry* **248**:186–188.
- Parthasarathy R, Jameson GJ, Ahmed N. 1991. Bubble breakup in stirred vessels : predicting the Sauter mean diameter. *Chemical engineering research & design* **69**:295–301.
- Pasteur L. 1857. Mémoire sur la fermentation appelée lactique. Mémoire sur la fermentation alcoolique.
- Pathways ME of M. MetaCyc Encyclopedia of Metabolic Pathways. <http://metacyc.org/>.
- Patnaik PR. 2003. Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae*: an overview of mechanisms and models. *Biotechnology Advances* **21**:183–192.
- Pattison RN, Swamy J, Mendenhall B, Hwang C, Frohlich BT. 2000. Measurement and control of dissolved carbon dioxide in mammalian cell culture processes using an in situ fiber optic chemical sensor. *Biotechnology Progress* **16**:769–74.
- Peña A. 1975. Studies on the mechanism of K⁺ transport in yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **167**:397–409.
- Perlin DS, San Francisco MJD, Slayman CW, Rosen BP. 1986. H⁺ATP stoichiometry of proton pumps from *Neurospora crassa* and *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **248**:53–61.
- Petrik M, Kappeli O, Fiechter A. 1983. An Expanded Concept for the Glucose Effect in the Yeast *Saccharomyces uvarum*: Involvement of Short- and Long-term Regulation. *Microbiology* **129**:43–49.

- Pharamond J-C. 1973. Contribution à l'étude de l'agitation en milieu aéré; Université Paul Sabatier Toulouse III.
- Piper P, Mahé Y, Thompson S, Pandjaitan R, Holyoak C, Egner R, Mühlbauer M, Coote P, Kuchler K. 1998. The *pdr12* ABC transporter is required for the development of weak organic acid resistance in yeast. *The EMBO journal* **17**:4257–65.
- Piper P, Calderon CO, Hatzixanthis K, Mollapour M. 2001. Weak acid adaptation: the stress response that confers yeasts with resistance to organic acid food preservatives. *Microbiology* **147**:2635–2642.
- Poilpré E. 2002. Mécanisme d'adaptation rapide de *Saccharomyces cerevisiae* en métabolisme oxydatif : implication des sucres de réserve et de la capacité respiratoire; Toulouse, INSA.
- Popovic M, Papalexiou A, Reuss M. 1983. Gas residence time distribution in stirred tank bioreactors. *Chemical Engineering Science* **38**:2015–2025.
- Porro D, Branduardi P. 2009. Yeast cell factory: fishing for the best one or engineering it? *Microbial cell factories* **8**:51.
- Porro D, Sauer M, Branduardi P, Mattanovich D. 2005. Recombinant protein production in yeasts. *Molecular biotechnology* **31**:245–59.
- Postma E, Verduyn C, Scheffers WA, Van Dijken JP. 1989. Enzymic analysis of the crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Envir. Microbiol.* **55**:468–477.
- Potter CPS, Harris AL. 2003. Diagnostic, prognostic and therapeutic implications of carbonic anhydrases in cancer. *British journal of cancer* **89**:2–7.
- Preusting H, van Houten R, Hoefs A, van Langenberghe EK, Favre-Bulle O, Witholt B. 1993. High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: growth and production of poly (3-hydroxyalkanoates) in two-liquid phase batch and fed-batch systems. *Biotechnology and bioengineering* **41**:550–6.
- Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast (Chichester, England)* **12**:1607–33.
- Pronk JT, Wenzel TJ, Luttik MAH, Klaassen CCM, Scheffers WA, Steensma HY, van Dijken JP. 1994. Energetic aspects of glucose metabolism in a pyruvate-dehydrogenase-negative mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **140**:601–610.
- Puskeiler R, Edler M, Didzus K, Müller R, Gabelsberger J. 2012. Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Animal Cell Technology (ESACT), Dublin, Ireland, June 7-10, 2009. Ed. Nigel Jenkins, Niall Barron, Paula Alves. Dordrecht: Springer Netherlands 451-454 p.
- Quicker G, Schumpe A, König B, Deckwer W-D. 1981. Comparison of measured and calculated oxygen solubilities in fermentation media. *Biotechnology and Bioengineering* **23**:635–650.

- Raghevendran V, Patil KR, Olsson L, Nielsen J. 2006. Hap4 is not essential for activation of respiration at low specific growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of Biological Chemistry* **281**:12308–14.
- Renger RS. 1991. Carbon dioxide and its relevance to large-scale brewery fermentation.; Technical University of Delft.
- Renger RS, Hateren SH van, Luyben KCAM. 1992. The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation : the effect of carbon dioxide pressure. *Journal of the Institute of Brewing* **98**:509–513.
- Richard L, Guillouet SE, Uribe Larrea J-L. 2014. Quantification of the transient and long-term response of *Saccharomyces cerevisiae* to carbon dioxide stresses of various intensities. *Process Biochemistry*.
- Rieger M, Kappeli O, Fiechter A. 1983. The Role Of Limited Respiration In The Incomplete Oxidation Of Glucose By *Saccharomyces Cerevisiae*. *Microbiology* **129**:653–661.
- Rischbieter E, Schumpe A, Wunder V. 1996. Gas Solubilities in Aqueous Solutions of Organic Substances. *Journal of Chemical & Engineering Data* **41**:809–812.
- Roustan M. 1978. Contribution à l'étude des phénomènes d'agitation et de transfert de matière des réacteurs gaz - liquide.; Université Paul Sabatier Toulouse III.
- Roustan M. 2005. Agitation. Mélange - Caractéristiques des mobiles d'agitation. *Techniques de l'ingénieur*.
- Roustan M, Pharamond J-C, Line A. 1999. Agitation. Mélange - Concepts théoriques de base. *Techniques de l'ingénieur*.
- Roy RN, Roy LN, Vogel KM, Porter-Moore C, Pearson T, Good CE, Millero FJ, Campbell DM. 1993. The dissociation constants of carbonic acid in seawater at salinities 5 to 45 and temperatures 0 to 45°C. *Marine Chemistry* **44**:249–267.
- Royce PN. 1992. Effect of changes in the pH and carbon dioxide evolution rate on the measured respiratory quotient of fermentations. *Biotechnology and Bioengineering* **40**:1129–38.
- Royce PNC, Thornhill NF. 1991. Estimation of dissolved carbon dioxide concentrations in aerobic fermentations. *AIChE Journal* **37**:1680–1686.
- Ryan H, Ryan J., O'Connor W. 1971. The effect of diffusible acids on potassium ion uptake by yeast.
- Ryan H, Ryan J., O'Connor W. 1972. The role of intracellular pH in the regulation of cation exchanges in yeast.
- Sander R. 1999. Compilation of Henry's Law Constants for Inorganic and Organic Species of Potential Importance in Environmental Chemistry.

- Satroutdinov AD, Kuriyama H, Kobayashi H. 1992. Oscillatory metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* in continuous culture. *FEMS Microbiology Letters* **98**:261–267.
- Schaber J, Adrover MA, Eriksson E, Pelet S, Petelenz-Kurdziel E, Klein D, Posas F, Goksör M, Peter M, Hohmann S, Klipp E. 2010. Biophysical properties of *Saccharomyces cerevisiae* and their relationship with HOG pathway activation. *European biophysics journal : EBJ* **39**:1547–56.
- Schaepe S, Kuprijanov A, Sieblist C, Jenzsch M, Simutis R, Lübbert A. 2013. kLa of stirred tank bioreactors revisited. *Journal of biotechnology* **168**:576–83.
- Schmidt FR. 2005. Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied microbiology and biotechnology* **68**:425–35.
- Schulz KGG, Riebesell U, Rost B, Thoms S, Zeebe REE. 2006. Determination of the rate constants for the carbon dioxide to bicarbonate inter-conversion in pH-buffered seawater systems. *Marine chemistry* **100**:53–65.
- Schumpe A, Quicker G, Deckwer W-D. 1982. Gas solubilities in microbial culture media. In: . *Reaction Engineering, Advances in Biochemical Engineering Volume 24*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, Vol. 24, p. pp 1–38.
- Schumpe A, Deckwer W-D. 1979. Estimation of O₂ and CO₂ solubilities in fermentation media. *Biotechnology and Bioengineering* **21**:1075–1078.
- Schumpe A, Deckwer W-D. 1980. Analysis of chemical methods for determination of interfacial areas in gas-in-liquid dispersions with non-uniform bubble sizes. *Chemical Engineering Science* **35**:2221–2234. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0009250980850482>.
- Schumpe A. 1993. The estimation of gas solubilities in salt solutions. *Chemical Engineering Science* **48**:153–158.
- Sears DF. 1961. A Model Representing a Physiological Role of CO₂ at the Cell Membrane. *The Journal of General Physiology* **44**:869–887.
- Serrano R. 1984. Plasma membrane ATPase of fungi and plants as a novel type of proton pump. *Current topics in cellular regulation* **23**:87–126.
- Setchenow M. 1982. Action de l'acide carbonique sur les solutions des sels a acides forts. **25**:226–270.
- Severinghaus JW, Bradley AF. 1958. Electrodes for Blood pO₂ and pCO₂ Determination. *Journal of Applied Physiology* **13**:515–520.
- Shen H-Y, De Schrijver S, Moonjai N, Verstrepen KJ, Delvaux F, Delvaux FR. 2004. Effects of CO₂ on the formation of flavour volatiles during fermentation with immobilised brewer's yeast. *Applied microbiology and biotechnology* **64**:636–43.

- Sherstobitova TS, Bylinkina E. 1977. Correlation between mass transfer coefficients with respect to O₂ and CO₂ in antibiotic synthesis. *Antibiotiki A.* **22**:675–678.
- Sieblist C, Hägeholz O, Aehle M, Jenzsch M, Pohlscheidt M, Lübbert A. 2011. Insights into large-scale cell-culture reactors: II. Gas-phase mixing and CO₂ stripping. *Biotechnology journal* **6**:1547–56.
- Sigler K, Kotyk A, Knotková A, Opekarová M. 1981. Processes involved in the creation of buffering capacity and in substrate-induced proton extrusion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **643**:583–592.
- Sillje HHW, Paalman JWG, ter Schure EG, Olsthoorn SQB, Verkleij AJ, Boonstra J, Verrips CT. 1999. Function of Trehalose and Glycogen in Cell Cycle Progression and Cell Viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* **181**:396–400.
- Simon SA, Gutknecht J. 1980. Solubility of carbon dioxide in lipid bilayer membranes and organic solvents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes* **596**:352–358.
- Van der Sluis C, Westerink BH, Dijkstal MM, Castelein SJ, van Boxtel AJ, Giuseppin ML, Tramper J, Wijffels RH. 2001. Estimation of steady-state culture characteristics during acceleration-stats with yeasts. *Biotechnology and bioengineering* **75**:267–75.
- Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, Ferry JG. 1999. Carbonic anhydrase is an ancient enzyme widespread in prokaryotes. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **96**:15184–15189.
- Smith KS, Ferry JG. 2000. Prokaryotic carbonic anhydrases. *FEMS Microbiology Reviews* **24**:335–366.
- Smith MM, Ho CS. 1985. On dissolved carbon dioxide in penicillin fermentations. *Chemical Engineering Communications* **37**:21–27.
- Sonnleitner B, Käppeli O. 1986. Growth of *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by its limited respiratory capacity: Formulation and verification of a hypothesis. *Biotechnology and bioengineering* **28**:927–37.
- Spadiut O, Rittmann S, Dietzsch C, Herwig C. 2013. Dynamic process conditions in bioprocess development. *Engineering in Life Sciences* **13**:88–101.
- Spilimbergo S, Elvassore N, Bertucco A. 2002. Microbial inactivation by high-pressure. *The Journal of Supercritical Fluids* **22**:55–63.
- Spilimbergo S, Quaranta A, Garcia-Gonzalez L, Contrini C, Cinquemani C, Van Ginneken L. 2010. Intracellular pH measurement during high-pressure CO₂ pasteurization evaluated by cell fluorescent staining. *The Journal of Supercritical Fluids* **53**:185–191.
- Spilimbergo S, Bertucco A, Basso G, Bertoloni G. 2005. Determination of extracellular and intracellular pH of *Bacillus subtilis* suspension under CO₂ treatment. *Biotechnology and bioengineering* **92**:447–51.

- Srinivasan S, Feng S, Lin Y-H. 2012. Dissolved carbon dioxide concentration profiles during very-high-gravity ethanol fermentation. *Biochemical Engineering Journal* **69**:41–47.
- Sunya S, Delvigne F, Uribe Larrea J-L, Molina-Jouve C, Gorret N. 2012. Comparison of the transient responses of *Escherichia coli* to a glucose pulse of various intensities. *Applied microbiology and biotechnology* **95**:1021–34.
- Swart CW, Dithébe K, Pohl CH, Swart HC, Coetsee E, van Wyk PWJ, Swarts JC, Lodolo EJ, Kock JLF. 2012. Gas bubble formation in the cytoplasm of a fermenting yeast. *FEMS yeast research* **12**:867–9.
- Swierczynski J, Davis EJ. 1978. Activation of succinate dehydrogenase by bicarbonate. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **85**:1173–1179.
- Taymaz-Nikerel H, van Gulik WM, Heijnen JJ. 2011. *Escherichia coli* responds with a rapid and large change in growth rate upon a shift from glucose-limited to glucose-excess conditions. *Metabolic engineering* **13**:307–18.
- TEOS. 2010. Thermodynamic Equation of SeaWater 2010 (TEOS-10).
- Thibault J, Leduy A, Côté F. 1987. Production of ethanol by *Saccharomyces cerevisiae* under high-pressure conditions. *Biotechnology and Bioengineering* **30**:74–80.
- Trambouze P, Euzen J-P. 2002. Les réacteurs chimiques: de la conception à la mise en oeuvre Ophrys. 681 p.
- Tripp BC, Smith K, Ferry JG. 2001. Carbonic anhydrase: new insights for an ancient enzyme. *The Journal of Biological Chemistry* **276**:48615–8.
- Uhl V., Gray J. 1966. Mixing: theory and practice.
- Ullah A, Chandrasekaran G, Brul S, Smits GJ. 2013. Yeast adaptation to weak acids prevents futile energy expenditure. *Frontiers in microbiology* **4**:142.
- Ullah A, Orij R, Brul S, Smits GJ. 2012. Quantitative analysis of the modes of growth inhibition by weak organic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and environmental microbiology* **78**:8377–87.
- Unesco ed. 1981. Background papers and supporting data on the practical salinity scale 1978.
- Uribe Larrea JL, Pacaud S, Goma G. 1985. New method for measuring the cell water content by thermogravimetry. *Biotechnology Letters* **7**:75–80.
- Van Urk H, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. 1989. Glucose Transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative Yeasts. *Microbiology* **135**:2399–2406.
- Van Urk H, Schipper D, Breedveld GJ, Mak PR, Alexander Scheffers W, van Dijken JP. 1989. Localization and kinetics of pyruvate-metabolizing enzymes in relation to aerobic alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* CBS 8066 and *Candida utilis* CBS 621. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* **992**:78–86.

- Van Urk H, Voll WSL, Scheffers WA, Van Dijken JP. 1990. Transient-State Analysis of Metabolic Fluxes in Crabtree-Positive and Crabtree-Negative Yeasts. *Appl. Envir. Microbiol.* **56**:281–287.
- Van't Riet K. 1979. Review of Measuring Methods and Results in Nonviscous Gas-Liquid Mass Transfer in Stirred Vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **18**:357–364.
- Van't Riet K, Tramper H. 1991. Basic Bioreactor Design. Ed. NY USA Marcel Dekker, Inc.
- Vemuri GN, Eiteman MA, McEwen JE, Olsson L, Nielsen J. 2007. Increasing NADH oxidation reduces overflow metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**:2402–7.
- Vemuri GN. 2007. Systems biology of overflow metabolism; uga.
- Verduyn C. 1992. Energetic aspects of metabolic fluxes in yeasts. *Energetics aspects of metabolic fluxes in Yeast*; Delft Technical University.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, Van Dijken JP. 1992. Effect of benzoic acid on metabolic fluxes in yeasts: a continuous-culture study on the regulation of respiration and alcoholic fermentation. *Yeast (Chichester, England)* **8**:501–17.
- Verduyn C, Postma E, Scheffers WA, van Dijken JP. 1990. Physiology of *Saccharomyces Cerevisiae* in Anaerobic Glucose-Limited Chemostat Cultures. *Journal of General Microbiology* **136**:395–403.
- Verduyn C, Stouthamer AH, Scheffers WA, Dijken JP. 1991. A theoretical evaluation of growth yields of yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek* **59**:49–63.
- Verduyn C, Zomerdijsk TPL, Dijken JP, Scheffers WA. 1984. Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied Microbiology and Biotechnology* **19**:181–185.
- Vezzù K, Sforza E, Sudiro M, Benedetti P, Losasso C, Bertuccio A. 2009. Production of bioethanol under high pressure of CO₂: The effect of process conditions. *The Journal of Supercritical Fluids* **51**:67–73.
- Visser D, van Zuylen GA, van Dam JC, Oudshoorn A, Eman MR, Ras C, van Gulik WM, Frank J, van Dedem GWK, Heijnen JJ. 2002. Rapid sampling for analysis of in vivo kinetics using the BioScope: a system for continuous-pulse experiments. *Biotechnology and bioengineering* **79**:674–81.
- Visser W, Scheffers WA, Batenburg-van der Vegte WH, van Dijken JP. 1990. Oxygen requirements of yeasts. *Appl. Envir. Microbiol.* **56**:3785–3792.
- Voisin C. 2005. Quelques aspects de la nucléation des bulles de champagne dans une flûte et de leur ascension à petits nombres de Reynolds.; Université de Reims.

- Walker ME, Val DL, Rohde M, Devenish RJ, Wallace JC. 1991. Yeast pyruvate carboxylase: Identification of two genes encoding isoenzymes. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **176**:1210–1217.
- Wanders RJA, Meijer AJ, Groen AK, Tager JM. 1983. Bicarbonate and the Pathway of Glutamate Oxidation in Isolated Rat-Liver Mitochondria. *European Journal of Biochemistry* **133**:245–254.
- Watanabe T, Furukawa S, Kitamoto K, Takatsuki A, Hirata R, Ogihara H, Yamasaki M. 2005. Vacuolar H⁺-ATPase and plasma membrane H⁺-ATPase contribute to the tolerance against high-pressure carbon dioxide treatment in *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* **105**:131–137.
- Weisenberger S, Schumpe A. 1996. Estimation of gas solubilities in salt solutions at temperatures from 273 K to 363 K. *AIChE Journal* **42**:298–300.
- Weiss RF. 1974. Carbon dioxide in water and seawater: the solubility of a non-ideal gas. *Marine Chemistry* **2**:203–215.
- Wilke CR, Chang P. 1955. Correlation of diffusion coefficients in dilute solutions. *AIChE Journal* **1**:264–270.
- Wilt P. 1986. Nucleation rates and bubble stability in water-carbon dioxide solutions. *Journal of Colloid and Interface Science* **112**:530–538.
- Wu L, Lange HC, Van Gulik WM, Heijnen JJ. 2003. Determination of in vivo oxygen uptake and carbon dioxide evolution rates from off-gas measurements under highly dynamic conditions. *Biotechnology and bioengineering* **81**:448–58.
- Yagi H, Yoshida F. 1975. Gas Absorption by Newtonian and Non-Newtonian Fluids in Sparged Agitated Vessels. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development* **14**:488–493.
- Yagi H, Yoshida F. 1977. Desorption of carbon dioxide from fermentation broth. *Biotechnology and Bioengineering* **19**:801–819.
- Zelle RM, de Hulster E, Kloezen W, Pronk JT, van Maris AJA. 2010. Key process conditions for production of C(4) dicarboxylic acids in bioreactor batch cultures of an engineered *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Applied and environmental microbiology* **76**:744–50.
- Zeylemaker WP, Klaasse ADM, Slater EC, Veeger C. 1970. Studies on succinate dehydrogenase. VI. Inhibition by monocarboxylic acids. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Enzymology* **198**:415–422.
- Zhang J, Davis TA, Matthews MA, Drews MJ, LaBerge M, An YH. 2006. Sterilization using high-pressure carbon dioxide. *The Journal of Supercritical Fluids* **38**:354–372.
- Zhao R, Reithmeier RAF. 2001. Expression and characterization of the anion transporter homologue YNL275w in *Saccharomyces cerevisiae*. *Am J Physiol Cell Physiol* **281**:C33–45.

1. Influence de la température et de la composition du milieu sur les coefficients de Henry

Thermodépendance

Les coefficients de solubilité H_{CO_2} et H_{O_2} dépendent de la température et de la composition du milieu. Les coefficients de Henry dans l'eau pure sont nommés $H_{CO_2}^0$ et $H_{O_2}^0$ respectivement. La thermodépendance des coefficients de Henry est résolue par l'Equation 195, issue de l'équation de Van't Hoff.

$$H_{CO_2}^{0,T} = H_{CO_2}^{0,ref} \times \exp\left(\frac{-\Delta solH}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{ref}}\right)\right) \quad \text{Equation 195}$$

Avec	T_{ref}	Température de l'état de référence (K)
	T	Température de l'état étudié (K)
	$H_{CO_2}^{0,T}$	Coefficient de Henry du CO_2 dans l'eau pure à l'état étudié ($\text{mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$)
	$H_{CO_2}^{0,ref}$	Coefficient de Henry du CO_2 dans l'eau pure à l'état de référence ($\text{mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$)
	$\Delta solH$	Enthalpie de la solution (J)
	R	Constante des gaz parfaits ($\text{J.mole}^{-1}.\text{K}^{-1}$)

L'état de référence est définie comme $T_{ref} = 298.15 \text{ K}$ (Sander, 1999). Pour le dioxyde de carbone le coefficient de Henry dans l'eau pure dans l'état de référence est $H_{CO_2}^{0,ref} = 3.362 \times 10^{-4} \pm 1.166 \times 10^{-5} \text{ mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$ (Sander, 1999). Pour l'oxygène le coefficient de Henry dans l'eau pure dans l'état de référence est $H_{O_2}^{0,ref} = 1.125 \times 10^{-5} \pm 5.096 \times 10^{-7} \text{ mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$ (Sander, 1999).

La thermodépendance du coefficient de Henry dans l'eau pure peut également être résolue de façon plus pratique en considérant les abaques établis en océanographie. La salinité S à considérer est alors nulle. Les coefficient de Henry dans l'eau pure dans l'état de référence pour le dioxyde de carbone et l'oxygène sont de $3.362 \times 10^{-4} \text{ mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$ (Weiss, 1974) et de $1.220 \times 10^{-5} \text{ mole.m}^{-3}.\text{Pa}^{-1}$ (Benson et al., 1979) respectivement. Ces abaques sont donc cohérents avec les données rassemblées par (Sander, 1999).

Le coefficient de Henry pour la dioxyde de carbone dans l'eau pure est de 35 à 24 fois supérieure au coefficient de Henry de l'oxygène dans l'eau pure sur la gamme de température $[0,50] \text{ } ^\circ\text{C}$ (Figure 43).

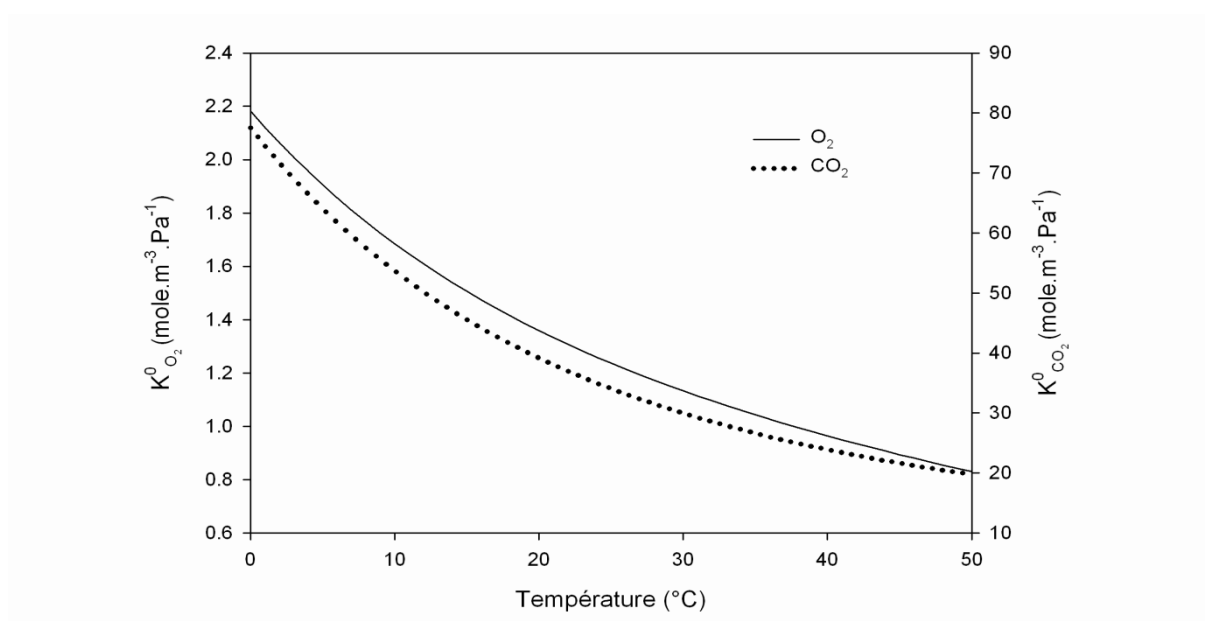


Figure 43. Evolution des coefficients de Henry dans l'eau pure en fonction de la température pour le dioxyde de carbone et l'oxygène.

Influence de la composition du milieu

Les coefficients de Henry du dioxyde de carbone et de l'oxygène dépendent également de la composition du milieu et notamment de la présence de sels. Plusieurs approches peuvent être utilisées pour déterminer l'impact de la force ionique du milieu sur la solubilité des gaz dissous.

Une approche pratique par abaques est utilisée dans le domaine de l'océanographie. Le paramètre permettant de tenir compte de la force ionique du milieu est le terme de salinité. La salinité pratique S d'un milieu, telle qu'utilisée dans les abaques, a été définie via le rapport K_{15} entre la conductivité d'un échantillon de ce milieu et la conductivité d'une solution de KCl de concentration $32.4356 \text{ g}_{KCl} \cdot \text{kg}_{\text{solution}}^{-1}$ à 15°C sous une pression de 101325 Pa : un rapport égal à l'unité équivaut à une salinité de 35 PSU. (Unesco, 1981). Cette définition de la salinité ne correspond pas aux unités du système international et a récemment été corrigée afin d'utiliser préférentiellement la salinité absolue S_A exprimée en $\text{g}_{\text{sels}} \cdot \text{kg}_{\text{solution}}^{-1}$ (TEOS, 2010). La différence relative entre la salinité pratique et la salinité absolue est faible ($<0.5\%$) et dans le cadre d'une étude en conditions de culture il est plus aisé d'utiliser la salinité absolue S_A qui peut être déduite directement de la composition du milieu salin. Les abaques seront donc utilisés en utilisant la salinité absolue S_A et non la salinité pratique S .

La valeur du coefficient de Henry du dioxyde de carbone en fonction de la salinité pratique du milieu et de la température peut être calculée par l'Equation 196 (Weiss, 1974) et celle de l'oxygène par l'Equation 197 (Benson et al., 1979).

$$H_{CO_2}^0 = \exp \left(\frac{9345}{T} - 60.2409 + 23.3585 \times \log \left(\frac{T}{-100} \right) + \left(\frac{0.023517 - T \times 2.3656 \times 10^{-4}}{T^2 \times 4.7036 \times 10^{-7}} + \right) \times S \right) \quad \text{Equation 196}$$

Avec T Température (K)
 S Salinité ($\text{g}_{\text{sels}} \cdot \text{kg}_{\text{solution}}^{-1}$)
 $H_{CO_2}^0$ Solubilité du dioxyde de carbone ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

$$H_{O_2}^0 = \exp \left(\frac{-135.29996 + \frac{1.572288 \times 10^5}{T} + \frac{6.637149 \times 10^{-7}}{T^2} + \frac{1.243678 \times 10^{10}}{T^3} - \frac{8.621061 \times 10^{-11}}{T^4}}{-\left(\frac{0.020573}{T} + \frac{2.3631 \times 10^3}{T^2} \right) \times S} \right) \quad \text{Equation 197}$$

Avec T Température (K)
 S Salinité ($\text{g}_{\text{sels}} \cdot \text{kg}_{\text{solution}}^{-1}$)
 $H_{O_2}^0$ Solubilité de l'oxygène ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

Une approche théorique a été développée par Schumpe (Schumpe and Deckwer, 1979) sur la base des travaux de Setchenov (Setchenow, 1982). Cette approche décrit l'évolution du coefficient de Henry dans l'état de référence dans la solution saline considérée par rapport à sa valeur dans l'eau pure en raison de la présence d'un sel i.

$$\log \left(\frac{H_{CO_2}^s}{H_{CO_2}^0} \right) = SE_i \cdot x_i \quad \text{Equation 198}$$

Avec $H_{CO_2}^s$ Coefficient de Henry du CO_2 dans la solution saline ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)
 $H_{CO_2}^0$ Coefficient de Henry du CO_2 dans l'eau pure ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)
 SE_i Coefficient de Setchenow de l'espèce i dans l'état de référence ($\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1}$)
 x_i Concentration de l'espèce i dans la phase liquide ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3}$)

Le calcul du coefficient de Setchenow a longtemps été réalisé en tenant compte uniquement de la force ionique du milieu (Schumpe and Deckwer, 1979).

$$SE_i = \sum_i H_i \cdot I_i \quad \text{Equation 199}$$

Avec SE_i Coefficient de Setchenow caractéristique du milieu dans l'état de référence ($\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1}$)

H_i Constante spécifique de l'espèce i ($\text{g} \cdot \text{m}^{-3}_{\text{ion}}$)

I_i Contribution de l'espèce i à la force ionique du milieu ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3}$)

Une formulation plus générale a été proposée prenant en compte la nature du gaz et de la variation de la solubilité en fonction de la température (Schumpe, 1993; Weisenberger and Schumpe, 1996)

$$\log \left(\frac{K_{CO_2}}{K_{CO_2}^0} \right) = \sum_i (h_i + h_g) \cdot x_i \quad \text{Equation 200}$$

Avec H_{CO_2} Coefficient de Henry du CO_2 dans la solution saline ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

$H_{CO_2}^0$ Coefficient de Henry du CO_2 dans l'eau pure ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

x_i Concentration de l'espèce i dans la phase liquide ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3}$)

h_i Paramètre spécifique de l'espèce i ($\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1}$)

h_g Paramètre spécifique du gaz considéré ($\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

Le paramètre spécifique du gaz h_g est calculé par

$$h_g = h_{G,0} + h_T (T - 298.15) \quad \text{Equation 201}$$

Avec $h_{G,0}$ Paramètre spécifique du gaz dans l'état de référence ($\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1}$)

h_T Paramètre spécifique du gaz pour la thermodépendance ($\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

T Température (K)

Les valeurs des paramètres h_i , $h_{G,0}$ et h_T font l'objet d'abaques (Weisenberger and Schumpe, 1996).

L'influence de composés non électrolytes, comme les sucres et les alcools, sur la solubilité des gaz en solution a également été étudiée par le biais de ces modèles (Rischbieter et al., 1996). Il a été prouvé que l'action des électrolytes et l'action des substances organiques sur la solubilité d'un gaz sont log- additionnables (Quicker et al., 1981)

$$\log \left(\frac{H_{CO_2}^{m,s}}{H_{CO_2}^0} \right) = \sum_i (h_i + h_g) \cdot x_i + \log \left(\frac{H_{CO_2}^m}{H_{CO_2}^0} \right) \quad \text{Equation 202}$$

Avec $H_{CO_2}^m$ Coefficient de Henry du CO_2 dans la solution contenant les molécules organiques ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

$H_{CO_2}^s$ Coefficient de Henry du CO_2 dans la solution saline ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

$H_{CO_2}^{m,s}$ Coefficient de Henry du CO_2 dans la solution réelle (électrolytes + molécules organiques) ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

$H_{CO_2}^0$ Coefficient de Henry du CO_2 dans l'eau pure ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3} \cdot \text{Pa}^{-1}$)

x_i Concentration de l'espèce i dans la phase liquide ($\text{mole} \cdot \text{m}^{-3}$)

h_i Paramètre spécifique de l'espèce i ($\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1}$)

h_g Paramètre spécifique du gaz considéré ($\text{m}^3 \cdot \text{mole}^{-1} \cdot \text{K}^{-1}$)

La réaction biologique peut modifier la composition du milieu en cours de culture et donc la solubilité des gaz dissous. Ainsi la variation relative maximale de la solubilité de l'oxygène au cours d'une culture batch de *Penicillium chrysogenum* atteint + 10.4% (Schumpe et al., 1982).

2. Influence de la composition du milieu sur les constantes d'équilibre

Les constantes apparentes d'équilibre K_1 et K_2 sont fonction de la température et de la salinité et ont été tabulées. Les travaux les plus utilisés sont ceux de (Dickson and Millero, 1987), reprenant des données expérimentales de (Hansson, 1973; Mehrbach, 1973), de (Roy et al., 1993) et de (Lueker et al., 1999).

Abaques de (Roy et al., 1993)

$$pK_1 = -\log \left(\exp \left(\begin{aligned} & \left(2.83655 - \frac{2307.1266}{T} - 1.552941 \times \ln(T) \right) \\ & + \left(-0.20760841 - \frac{4.0484}{T} \right) \times S^{0.5} \\ & + 0.08468345 \times S \\ & - 0.00654208 \times S^{1.5} \end{aligned} \right) \right) \quad \text{Equation 203}$$

$$pK_2 = -\log \left(\exp \left(\begin{aligned} & \left(9.226508 - \frac{3351.6106}{T} - 0.2005743 \times \ln(T) \right) \\ & + \left(-0.106901773 - \frac{23.9722}{T} \right) \times S^{0.5} \\ & + 0.1130822 \times S \\ & - 0.00654208 \times S^{1.5} \end{aligned} \right) \right) \quad \text{Equation 204}$$

Avec T Température (K)

S Salinité

Abaques de (Lueker et al., 1999)

$$pK_1 = \frac{3633.6}{T} - 61.2176 + 9.67770 \times \ln T - 0.011555 \times S + 0.0001152 \times S^2 \quad \text{Equation 205}$$

$$pK_2 = \frac{471.78}{T} + 25.9290 - 3.16967 \times \ln T - 0.01781 \times S + 0.0001122 \times S^2 \quad \text{Equation 206}$$

Abaques de (Dickson and Millero, 1987)

$$pK_1 = \frac{3670.7}{T} - 62.008 + 9.7944 \times \ln T - 0.0118 \times S + 0.000116 \times S^2 \quad \text{Equation 207}$$

$$pK_2 = \frac{1394.7}{T} + 4.777 - 0.0184 \times S - 0.011555 \times S + 0.000118 \times S^2 \quad \text{Equation 208}$$

Une comparaison des résultats donnés par ces trois abaques pour les constantes K1 et K2 dans l'eau pure et dans un milieu salin de salinité comparable à celle d'un moût de fermentation démontre que les résultats de ces différentes corrélations sont proches (Tableau 39).

Tableau 39. Comparaison des algorithmes prédictifs des constantes apparentes d'équilibre du dioxyde de carbone.

Référence	pK ₁ eau	pK ₂ eau	pK ₁ milieu S = 20 PSU	pK ₂ milieu salin S= 20 PSU
(Lueker et al., 1999)	6.110	9.451	5.925	9.140
(Dickson and Millero, 1987)	6.108	9.454	5.915	9.134
(Roy et al., 1993)	5.971	9.385	5.359	9.090

3. Nucléation

La sursaturation est définie comme un excès de la concentration en CO₂ dissous par rapport à une concentration de référence $x_{CO_2}^0$ obtenue pour des conditions de température et de pression constantes (Equation 209) (Voisin, 2005).

$$x_{CO_2}^0 = P \times H_{CO_2} \quad \text{Equation 209}$$

Avec $x_{CO_2}^0$ Concentration de référence en CO₂ dans la phase liquide (mole.m⁻³)

P Pression absolue (Pa)

H_{CO_2} Constante de Henry pour le dioxyde de carbone (mole.m⁻³.Pa⁻¹)

Le paramètre de sursaturation est alors défini par l'Equation 210. Les valeurs de s sont dans l'intervalle [-1, + ∞].

$$s = \frac{x_{CO_2} - x_{CO_2}^0}{x_{CO_2}^0} \quad \text{Equation 210}$$

Avec s Critère de sursaturation (adimensionnel)

x_{CO_2} Concentration en dioxyde de carbone dissous (mole.m⁻³)

$x_{CO_2}^0$ Concentration en dioxyde de carbone dissous de référence (mole.m⁻³)

Il existe quatre types de mécanismes de nucléation (Jones et al., 1999; Voisin, 2005).

Le mécanisme de nucléation de type I ou nucléation homogène décrit la formation de bulles « ex nihilo » au sein de la phase liquide (Jones et al., 1999). Ce mécanisme de nucléation ne s'appuie pas sur le contact avec un corps solide. Une bulle de gaz est susceptible de se former à partir du regroupement de molécules de dioxyde de carbone dissous en nuclei. Il existe une barrière d'énergie W_{hom} à franchir pour que la bulle puisse se former à partir d'un nucléus (Voisin, 2005). Ce seuil énergétique correspond à un rayon critique r_c : si le rayon du nucleus est supérieur à r_c alors la bulle naît, sinon le nucleus disparaît. Le rayon critique r_c est calculé à partir de l'Equation 211 et l'énergie nécessaire à la formation d'une bulle à partir de la phase liquide à partir de l'Equation 212 (Voisin, 2005).

$$r_c = \frac{2 \times \sigma}{P_L \times s} \quad \text{Equation 211}$$

Avec r_c Rayon critique de formation d'une bulle par nucléation de type I (m)
 σ Tension de surface de la phase liquide (N.m^{-1})
 P_G Pression partielle de la phase gaz en dioxyde de carbone (Pa)
 P_L Pression absolue de la phase liquide (Pa)

$$W_{\text{hom}} = \frac{4}{3} \times \pi \times \sigma \times r_c^2 \quad \text{Equation 212}$$

Avec W_{hom} Energie seuil de formation d'une bulle par nucléation de type I (J)
 σ Tension de surface de la phase liquide (N.m^{-1})
 r_c Rayon critique de formation d'une bulle par nucléation de type I (m)

La probabilité que cette barrière d'énergie W_{hom} soit atteinte localement dans la phase liquide correspond à la probabilité que des molécules de CO_2 se réunissent localement à une densité suffisante pour que le rayon du nucleus résultant soit supérieur à r_c . Cette probabilité est calculée par l'Equation 213.

$$P(W_{\text{hom}}) = \exp\left(-\frac{W_{\text{hom}}}{k_b \times T}\right) \quad \text{Equation 213}$$

Avec $P(W_{\text{hom}})$ Probabilité que le seuil énergétique W_{hom} soit atteint (adimensionnel)
 W_{hom} Energie seuil de formation d'une bulle par nucléation de type I (J)
 k_B Constante de Boltzmann (J.K^{-1})
 T Température (K)

Le taux de nucléation J_{hom} est alors calculé par l'Equation 214 (Wilt, 1986).

$$J_{\text{hom}} = N \times \left(\frac{2 \times \sigma}{\pi \times n}\right) \times P(W_{\text{hom}}) \quad \text{Equation 214}$$

Avec J_{hom} Taux de nucléation de type I ($\text{m}^{-3}.\text{s}^{-1}$)
 N Nombre total de molécules de CO_2 dans un volume donné (m^{-3})
 n Nombre de molécules de CO_2 impliquées dans les nuclei de rayon r_c (m^{-3})
 σ Tension de surface de la phase liquide (N.m^{-1})

Dans le cas de cultures microbiennes aérobies un gradient de concentration est nécessaire pour la désorption du dioxyde de carbone (même si l'équilibre thermodynamique est supposé à l'interface). Les performances de transfert permettent normalement d'assurer que la sursaturation du milieu soit faible, la valeur du paramètre s est alors négative ce qui conduit à des valeurs de r_c négatives. La nucléation homogène est donc impossible. Dans le cas de cultures microbiennes conduites en anaérobie ou micro-aérobie (vinification, brasserie) une sursaturation plus importante du moût de fermentation en dioxyde de carbone peut être atteinte. Dans le cas d'une culture à 30°C où la valeur de la sursaturation serait égale à l'unité, le taux de nucléation homogène est égal à $2.53 \times 10^{-11417066}$: la nucléation homogène est considérée comme non-existante (calculé avec Mathematica).

Le mécanisme de nucléation de type II ou nucléation hétérogène classique se produit lors d'une mise en sursaturation soudaine du système (par exemple lors d'une dépressurisation brutale d'un système gaz/liquide à l'équilibre) (Jones et al., 1999). La formation d'une bulle peut avoir lieu « ex nihilo » au contact d'une particule solide (comme les micro-organismes ou les protéines dans le milieu exo-cellulaire par exemple), de la paroi lisse du réacteur ou d'anfractuosités dans cette paroi lisse (rayures par exemple). Le phénomène de nucléation d'une bulle fait baisser la sursaturation locale et la probabilité de formation d'une seconde bulle est alors plus faible.

Le mécanisme de nucléation de type III ou nucléation hétérogène pseudo-classique se produit également au contact d'une particule solide, d'une paroi lisse ou accidentée (Jones et al., 1999). Dans le cas d'une mise en sursaturation de la phase liquide par rapport au dioxyde de carbone des nuclei issus du regroupement de molécules de dioxyde de carbone apparaissent au contact des corps solides. Les fluctuations locales de densité des molécules de dioxyde de carbone peuvent entraîner la formation de nuclei dont le rayon r excède r_c , permettant ainsi de franchir la barrière énergétique W_{het} déterminant la formation d'une bulle. Les nuclei dont le rayon ne dépasse pas r_c ne donnent pas lieu à nucléation.

Le mécanisme de nucléation de type IV ou nucléation hétérogène non classique se produit également à partir de nuclei au contact d'une particule solide, d'une paroi lisse ou accidentée (Jones et al., 1999). Lors de la mise en sursaturation ces nuclei ont un rayon r excédant et donne lieu à nucléation de bulles conduisant à une diminution locale de la sursaturation. Or d'après l'Equation 211 cela conduit à une augmentation de la valeur r_c . Lorsque le rayon r devient inférieur r_c la nucléation à partir du nucleus de rayon r s'arrête.

Dans le cas des trois mécanismes de nucléation hétérogène le bilan d'énergie libre sur la phase liquide, permettant le calcul de r_c et de W_{het} , doit prendre en compte les interactions avec un corps solide via un angle θ (Voisin, 2005). Les trois mécanismes de nucléation hétérogène sont

impossibles dans le cas de cultures aérobies où la valeur de la sursaturation est négative (culture aérobie) et où la pression est constante (pas de mise en sursaturation soudaine par dépressurisation).

Pour des cultures microbiennes conduites en anaérobie ou micro-aérobie (vinification, brasserie) la sursaturation du moût de fermentation en dioxyde de carbone peut être improbable. La probabilité du mécanisme de nucléation de type I reste cependant infime. La nucléation de type II est également improbable en dessous de valeurs de sursaturation inférieures à 100 (Wilt, 1986) mais une nucléation de type III ou IV peut se produire pour des valeurs de sursaturations aussi faibles que 0.1 (Voisin, 2005). Cela serait favorisé par les fortes concentrations en protéines dans les moûts de fermentation qui abaissent la tension superficielle et donc le rayon critique de nucléation (Equation 211).

4. Accélération du transfert gaz / liquide de l'O₂

Dans le cas d'un transfert unidirectionnel selon un axe z et d'une réaction chimique de consommation d'oxygène dans la couche limite liquide l'Equation 28 peut être écrite sous la forme de l'Equation 215 (Charpentier Jean-Claude et al., 1997). La surface d'échange est considérée comme un plan en raison de l'importance du rayon de courbure de bulle par rapport à l'épaisseur du film gazeux. L'axe z est perpendiculaire à cette surface d'échange.

$$D_A \frac{d^2 x_A}{dz^2} = \frac{d x_A}{dt} + r_A \quad \text{Equation 215}$$

Cette équation est résolue en considérant les conditions limites suivantes : en $z = 0$ $x = x^*$ (interface gaz / liquide), en $z = \delta$ $x_A = x_L$ (interface entre le film liquide et le cœur de la phase liquide). La solution analytique pour le calcul du profil de la concentration est donnée par l'Equation 216. La densité de flux de transfert à l'interface gaz / liquide peut alors être calculée à partir de l'Equation 27 (Equation 217), ce qui est équivalent à la forme présentée par (Trambouze and Euzen, 2002) (Equation 218).

$$x = \left(\frac{r_A}{2 \times D_A} \right) \cdot z^2 + \left(\frac{2 \times x_L \times D_A - r \times \delta^2 - 2 \times x_A^* \times D_A}{2 \times \delta \times D_A} \right) \times z + x_A^* \quad \text{Equation 216}$$

$$N_A^r = -D_A \times \left(\frac{r_A \times z}{D_A} + \frac{(2 \times x_L \times D_A - r \times \delta^2 - 2 \times x_A^* \times D_A)}{2 \times \delta \times D_A} \right) \quad \text{Equation 217}$$

$$N_A^r = r_A \frac{Ha}{\tanh(Ha)} \left(x^* - \frac{x}{\cosh(Ha)} \right) \quad \text{Equation 218}$$

Avec	Ha	Nombre de Hatta (-)
	δ	Epaisseur de la couche limite liquide (m)

Dans le cas simple où la réaction d'oxygène est d'ordre 1 par rapport à l'oxygène le nombre adimensionnel de Hatta est défini par l'Equation 219. Ce nombre représente donc la fraction maximale d'oxygène consommé dans la couche limite liquide par rapport à la quantité maximale traversant cette couche limite par diffusion (Charpentier Jean-Claude et al., 1997).

$$Ha^2 = \frac{D_A \times k_1}{k_L} \quad \text{Equation 219}$$

Avec k_1 Constante cinétique de la réaction du premier ordre de consommation d'oxygène (s^{-1})

k_L Conductance de transfert de l'oxygène dans la couche limite liquide ($m.s^{-1}$)

D_A Coefficient de diffusion de l'oxygène dans la phase liquide ($m^2.s^{-1}$)

Deux régimes ont été décrits en fonction de la valeur du nombre de Hatta (Charpentier Jean-Claude et al., 1997).

- si $Ha^2 < 1$ (équivalent à $Ha < 0.3$) on parle de réaction lente.
- si $Ha^2 > 1$ (équivalent à $Ha > 3$) on parle de réaction rapide.

L'accélération du transfert gaz / liquide de l'oxygène par une consommation de ce composé dans la couche limite liquide peut alors être exprimée par le facteur d'accélération E. Ce rapport E correspond au ratio de la densité du flux de transfert de l'oxygène au sein d'un liquide avec réaction simultanée par rapport au flux d'absorption en l'absence de réaction (Equation 220) (Charpentier Jean-Claude et al., 1997). Ce facteur d'accélération est calculé à la côte $z = 0$ correspondant au maximum de l'accélération.

$$E = \left(\frac{N_A^r}{N_A} \right)_{z=0} \quad \text{Equation 220}$$

Avec N_A^r Densité de flux en présence d'une réaction ($mole.m^{-2}.s^{-1}$)

N_A Densité de flux en l'absence d'une réaction chimique ($mole.m^{-2}.s^{-1}$)

5. Réactions prises en compte dans le modèle métabolique

glc + atp = glcp + adp	r1
glcp = frup	r2
frup + atp = gap + dhap + adp	r3
dhap = gap	r4
gap + nad + adp + p=pg + atp + nadh + h	r5
pg = pep + eau	r6
pep + adp = pyr + atp	r7
pyr = acd + co	r8
acd + nadh + h = etoh + nad	r9
acd + nadp + eau = acetat + nadph + h	r10

dhap + nadh + h = g3p + nad	r11
g3p + eau = glyc + p	r12
2 * atp + eau + acetat + coa = 2 * adp + 2 * p + accoa	r13
glcp + 2 * nadp + eau = ribup + 2 * nadph + 2 * h + co	r14
ribup = xylup	r15
ribup = ribop	r16
ribop + xylup = eryp + frup	r17
eryp + xylup = gap + frup	r18
akg + nh + nadph = glut + eau + nadp	r19
glut + atp + nh = glum + adp + p + h	r20
pyr + glut = ala + akg	r21
oac + glut = asp + akg	r22
asp + glum + 2 * atp + 2 * eau = asn + glut + 2 * p + 2 * adp	r23
ser + so + 3 * atp + 4 * nadph + 6 * h + accoa = cys + eau + 3 * adp + 3 * p + 4 * nadp + acetat + coa	r24
ser + nadp + nad + adp + p = gly + co + nadph + nadh + atp + 2 * h	r25
thr + pyr + glut + nadph + 2 * h = ileu + akg + co + eau + nh + nadp	r26
2 * glut + accoa + 2 * nad + 2 * nadph = lys + akg + coa + co + 2 * nadh + 2 * nadp	r27
asp + accoa + so + co + 5 * atp + 8 * nadph + nadh + 11 * h = met + acetat + coa + 2 * eau + 5 * adp + 5 * p + 8 * nadp + nad	r28
cho + glut = phe + akg + co + eau	r29
pg + glut + eau + nad = ser + akg + p + nadh + h	r30
asp + eau + 2 * atp + nadph + nadh + 2 * h = thr + 2 * adp + 2 * p + nadp + nad	r31
cho + glut + nad = tyr + akg + co + nadh + h	r32
cho + glum + ser + prpp = try + pyr + glut + gap + co + 2 * p + eau	r33
prpp + glum + co + nh + 3 * eau + 3 * atp + nad = his + akg + 3 * adp + 6 * p + nadh + 2 * h	r34
ribop + 2 * atp = prpp + 2 * adp	r35
eryp + 2 * pep + nadph + atp + h = cho + nadp + adp + 4 * p	r36
co + glum + 2 * eau + 2 * atp = carp + glut + 2 * adp + p	r37
prpp + 2 * glum + gly + asp + 3 * co + 2 * eau + 6 * atp + 2 * nadh + 2 * h = imp + 2 * glut + fum + 6 * adp + 8 * p + 2 * nad	r38
imp + asp + gtp + atp = 2 * adp + fum + gdp + p	r39
imp + glum + 3 * eau + 3 * atp + nad = gdp + glut + 3 * adp + 2 * p + nadh + h	r40
atp + nadph + h = datp + eau + nadp	r41
gdp + atp + nadph + h = dgtp + adp + eau + nadp	r42
carp + asp + prpp + 0.5 * o + atp = udp + co + eau + adp + 3 * p	r43
udp + atp = utp + adp	r44
utp + atp + nh = ctp + adp + p + h	r45
ctp + nadph + h = dctp + eau + nadp	r46
udp + co + 4 * atp + 3 * nadph + nadh + 4 * h = dttp + 4 * adp + 3 * p + 3 * nadp + nad	r47
glcp + utp + eau = udpg + 2 * p	r48
udpg + glcp + eau = tre + udp + p	r49
frup + gdp = gdpmannose + p	r50
frup + glum + accoa + eau + utp = udpacetylglucosamine + glut + coa + 2 * p	r51
8 * accoa + 14 * nadph + 7 * atp + eau + 14 * h = palmitate + 8 * coa + 14 * nadp + 7 * adp + 7 * p	r52
9 * accoa + 16 * nadph + 8 * atp + eau + 16 * h = stearate + 9 * coa + 16 * nadp + 8 * adp + 8 * p	r53
18 * accoa + 11 * eau + 14 * nadph + 18 * atp + o + 14 * h = lanosterol + 18 * coa + 14 * nadp + 18 * adp + 18 * p + 6 * co	r54
lanosterol + 3 * o + 3 * nad = zymosterol + 3 * co + 3 * nadh + 3 * h	r55
lanosterol + 2 * o + 2 * nad = fecosterol + 2 * co + 2 * nadh + 2 * h	r56
fecosterol = episterol	r57
episterol + nadp = ergosterol + nadph + h	r58
pextra + 2 * hextra = p + 2 * h	r59
nhextra + hextra = nh + h	r60
soextra + 3 * hextra = so + 3 * h	r61

atp + eau=adp + p	r62
h=hextra	r63
pyr + atp + co + eau = oac + adp + p	r64
glut=glutmi	r65
argmi = arg	r66
leumi = leu	r67
promi = pro	r68
valmi = val	r69
carp=carpmi	r70
asp=aspmi	r71
oac = oacmi	r72
akg = akgmi	r73
pyr = pyrmi	r74
sucmi = suc	r75
fum=fummi	r76
citmi = cit	r77
g3p + fadmi = dhap + fadhmi	r78
acd=acdmi	r79
acetatmi=acetat	r80
comi = co	r81
eaumi = eau	r82
atpmi = atp	r83
adpmi = adp	r84
pmi= p	r85
o=omi	r86
gtpmi = gtp	r87
gdp = gdpmi	r88
pyrmi + coami + nadmi = accoami + comi + nadhmi + hmi	r89
accoami + oacmi + eaumi = citmi + coami	r90
acdmi + nadpmi + eaumi = acetatmi + nadphmi + hmi	r91
citmi + nadmi = akgmi + nadhmi + hmi + comi	r92
akgmi + coami + nadmi = succoami + comi + nadhmi + hmi	r93
succoami + gdpmi + pmi = sucmi + gtpmi + coami	r94
sucmi + fadmi = fummi + fadhmi	r95
fummi + eaumi = malmi	r96
malmi + nadmi = oacmi + nadhmi + hmi	r97
gdpmi + atpmi = gtpmi + adpmi	r98
2 * glutmi + carpmi + aspmi + eaumi + 3 * atpmi + nadphmi + hmi = argmi + fummi + akgmi + 3 * adpmi + nadpmi + 4 * pmi	r99
2 * pyrmi + glutmi + accoami + nadmi + nadphmi = leumi + akgmi + coami + 2 * comi + nadhmi + nadpmi	r100
glutmi + atpmi + nadhmi + nadphmi + 2 * hmi = promi + eaumi + adpmi + pmi + nadpmi + nadmi	r101
2 * pyrmi + glutmi + nadphmi + hmi = valmi + akgmi + comi + eaumi + nadpmi	r102
nadhmi + 0.5 * omi + PO * adpmi + PO * pmi + hmi = PO * atpmi + nadmi + (1+PO) * eaumi	r103
fadhmi + 0.5 * omi + PO * adpmi + PO * pmi = PO * atpmi + fadmi + (1+PO) * eaumi	r104
protein	r105
RNA	r106
DNA	r107
phosphatidate	r108

	8
	r10
phosphatidylinositol	9
	r11
phosphatidylserine	0
	r11
phosphatidylcholine	1
	r11
diphosphatidylglycerol	2
	r11
phosphatidylethanolamine	3
	r11
phospholipids	4
	r11
tag	5
	r11
lanosterolester	6
	r11
zymosterolester	7
	r11
fecosterolester	8
	r11
episteolester	9
	r12
ergosterolester	0
	r12
se	1
	r12
lipids	2
	r12
glycogen	3
	r12
glucan	4
	r12
chitin	5
	r12
mannan	6
	r12
polysachh	7
	r12
X	8